

# **O POTENCIAL BIOATIVO DO SORO DE QUEIJO APÓS FERMENTAÇÃO LÁTICA**

## **COMPARAÇÃO DE DIFERENTES TIPOS DE SORO**

**Miguel Cortês de Abreu**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar**

Orientador: Doutora Maria Adélia Silva Santos Ferreira

Coorientadores: Doutora Ana Isabel Gusmão Lima

Mestre Maria Isabel da Silva Santos

**Júri:**

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro Brito, Professora Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Adélia Silva Santos Ferreira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

*“O que não nos mata torna-nos mais fortes.”*

Friedrich Nietzsche

## Agradecimentos

Antes de mais nada, é importante referir que nesta página não há primeiros ou segundos lugares, apenas uma ordem não intencional de agradecimento profundo a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a superação desta minha prova de fogo. Todos aqueles que aqui são referidos, são-no porque foram igualmente importantes para que eu pudesse estar a esta hora a escrever isto.

De qualquer das maneiras, tenho de agradecer profundamente à Profª Adélia Ferreira por me ter estendido a mão quando mais estava perdido e sem rumo certo e por me ter apoiado incansavelmente daí para a frente, não descansado até que visse concluído o meu trabalho. Foi uma contratação de inverno tardia, eu sei, mas devo-lhe um agradecimento especial, pois se assim não fosse estaria a ser ingrato. Muito obrigado, Professora!

Também tenho de agradecer à Ana e à Isabel, pela orientação, pelos preciosos ensinamentos que me transmitiram e por me terem mostrado que eu sou capaz de mais do que aquilo que pensava. Muito obrigado a ambas por isso! Não me esquecerei dos momentos que passamos juntos e do apoio que me prestaram.

Um agradecimento especial ao Prof. Manuel Malfeito, por me ter deixado utilizar o equipamento de HPLC e mais tarde ao “laboratório com vista privilegiada”. Não teria sido sequer a mesma coisa! E ao Prof. Ricardo Boavida, por ter dado acesso ao laboratório e me ter introduzido ao seu grupo de trabalho, onde conheci pessoas fantásticas.

Não posso passar sem agradecer ainda à malta do Laboratório, em especial: ao Miguel, por se ter mostrado um amigo incansável e por tudo aquilo que me ensinou; à Joana, por ser uma pessoa de carácter único e genuíno, sem a qual cantar Ivete Sangalo não era a mesma coisa; à Sabrina, por se ter revelado uma excelente companheira e por me ter aturado naquelas frustrações todas e maus humores (e eu a ter aturado a ela, claro!), mas também nas epifanias que partilhámos; ao Filipe e ao Filipe, por ser dois tipos impecáveis e bem-humorados; à Margarida, por me ter dado um enorme apoio nos ensaios das MICs; ao Ricardo Chagas, pela paciência e importante ajuda no deslinde dos problemas do HPLC; à Catarina, que embora estando ocupada com as aulas, não me deixou ficar mal com todos aqueles géis e eletroforeses; e à Jennifer e à Sara que, apesar de terem entrado para a equipa mais tarde, não deixam de ser duas pessoas que me marcaram, também.

À Carla por ter sido, como sempre, incansável na prestação de ajuda, durante a minha primeira fase da estadia, no Laboratório de Microbiologia; à Dona Manuela, por ser incansável no seu trabalho e que, sendo tão simples, possuiu um sentido de um humor e de boa disposição acima da média; e à Dona Lena, pela folia e boa disposição.

À Madalena, claro! Por simplesmente ser minha amiga e, para além de ser das pessoas mais bem dispostas do Mundo, ser também das mais preocupadas com quem estima.

Por último e mais importante, claro, à minha Sofia, por ser quem é para mim e por me ter dado um apoio que só ela sabia dar, sem o qual não teria sido capaz de prosseguir nesta jornada. Duas linhas muito resumidas, mas que sabes que só te podem pertencer a ti.

Muito provavelmente falta agradecer a alguém que não viu o seu nome referido neste trabalho, mas com certeza não estou esquecido do seu contributo.

A todos aqueles que referi e que me esqueci de referir, nunca é de mais salientar o meu Muito Obrigado por tudo!

## Resumo

A fermentação do soro de queijo com bactérias lácticas, além de produzir ácido láctico, pode resultar na proteólise das principais proteínas alergénicas do soro e na formação de polipéptidos com atividade antibacteriana, possuindo um grande potencial para a indústria alimentar. Neste contexto, pretendeu-se estudar se a utilização de diferentes tipos de soro de queijo (ovino, caprino e bovino), combinados com 3 estirpes diferentes de bactérias lácticas, poderia originar uma maior degradação proteolítica das principais proteínas, bem como aumentar a atividade antibacteriana. A produção de ácido láctico foi monitorizada com recurso a técnicas cromatográficas e o perfil proteico por técnicas eletroforéticas. Os polipéptidos da fração de baixo peso molecular foram isolados por ultrafiltração e testados em relação ao seu potencial antibacteriano, utilizando o modelo *Listeria monocytogenes*. De um modo geral, os resultados demonstram que o consumo das proteínas  $\alpha$ -lactalbumina e  $\beta$ -lactoglobulina, bem como a atividade antibacteriana, foram dependentes da estirpe utilizada, do tipo de soro e do tempo de fermentação. *Lactobacillus casei*, apesar de ser pouco conhecida acerca da sua atividade proteolítica, em relação às caseínas e às proteínas do soro, demonstrou ser uma espécie com elevado potencial fermentativo elevado, e com capacidade de produzir polipéptidos com atividade antibacteriana.

**Palavras-chave:** fermentação; soro de queijo; bactérias lácticas; ácido láctico; polipéptidos; atividade antibacteriana.

## Abstract

Cheese whey fermentation with lactic acid bacteria (LAB) results in the production of lactic acid, but can also induce the proteolysis of the major whey proteins, therefore originating polypeptides with antibacterial activities. This work set out to determine if by using different types of whey (ovine, caprine and bovine), inoculated with three different LAB strains, could enhance proteolysis degradation of major whey proteins and improve antibacterial activity. Lactic acid production was monitored throughout time by using chromatographic techniques and protein variations were evaluated by electrophoretic techniques. Low Molecular Weight (LMW) polypeptides were isolated by ultra filtration and tested for their bioactivities against the model bacteria *Listeria monocytogenes*. Overall, results showed that consumption of whey proteins  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin as well as antibacterial activities induced by fermentation were highly dependent on the bacterial strain, the type of whey used and the length of fermentation. Despite being little known by its proteolytic activity towards caseins and whey proteins, *Lactobacillus casei* proved to be a strain with high fermentative potential and the capacity to produce antibacterial polypeptides.

**Keywords:** cheese whey; fermentation; lactic acid bacteria; lactic acid; polypeptides; antibacterial activity.

## Extended abstract

Cheese whey is the major by-product of cheese industry, since near 89% of the milk used in cheese manufacture is converted to whey. In 2012, this industry produced about 170 million tons of whey, the highest value since 2002. Since it retains most of the nutrients of milk which are not used in cheese manufacture, whey has high values of chemical and biochemical oxygen demands that turn it into a serious environmental problem. In addition, due to its high content in lactose and other nutrients, whey should be valued in order to find alternatives for its use. There are many ways for valuing this product, namely the production of Requeijão, the incorporation in animal fed formulas, as substrate for ethanol production or even the incorporation in protein rich supplements.

Recently, many studies have focused their attention to whey proteins, namely  $\alpha$ -lactalbumin e  $\beta$ -lactoglobulin, which are milk's main protein allergens, but possess latent bioactive peptidic sequences, some of them considered to be as antimicrobial. Nonetheless, most works have failed to achieve the full degradation of these proteins. Fermentation can also be used to remove lactose, the compound responsible for milk intolerance, resulting in acid lactic formation, which as also been shown to have potential as an antibacterial agent.

Therefore, a new alternative for the use and valorization of cheese whey through fermentation with lactic acid bacteria was studied. Three strains of bacteria, namely *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum*, were used to ferment whey from three different ruminants (bovine, caprine and ovine whey), for a period of 144 hours, in order to study the influence of lactic fermentation on the hydrolysis of the major whey proteins and the antibacterial activity of the low molecular weight polypeptides. Therefore, the principal fermentative parameters (i.e. pH, lactose consumption and lactic acid production), the proteolysis of the major proteins and the antibacterial activity against the model *Listeria monocytogenes* were analyzed in daily samples.

Results show that both protein hydrolysis and antibacterial activity are dependent of the combination of strain and type of whey. In general, *L. casei* was the bacterial strain with better fermentative performance, in the three whey types, producing more lactic acid and being the only one able to induce antibacterial activity in the low molecular weight fractions.

This work suggests that whey fermentation with lactic acid bacteria is a possible alternative for the valorization of cheese whey and can be used either as disinfecting agent or to produce antibacterial polypeptides. However, proteolysis of whey proteins and the isolation of bioactive peptides should take into consideration the time of fermentation as also the combination of bacterial strains and type of whey. Also, the antibacterial potential of fermented whey, previously described in other works, was proved to be a result of high lactic acid concentrations.

# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo .....	v
Abstract.....	vi
Extended abstract.....	vii
Índice de figuras .....	xi
Lista de abreviaturas .....	xii
Enquadramento .....	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
1.1. A indústria do queijo .....	4
1.1.1. Aspetos económicos .....	4
1.1.2. Processo de fabrico .....	4
1.2. O soro de queijo .....	5
1.2.1. Caracterização geral .....	5
1.2.2. Caracterização proteica .....	7
1.2.2.1. $\beta$ -lactoglobulina .....	8
1.2.2.2. $\alpha$ -lactalbumina .....	9
1.2.2.3. Imunoglobulinas .....	9
1.2.2.4. Albumina do soro.....	10
1.2.2.5. Lactoferrina.....	10
1.2.2.6. Lactoperoxidase .....	10
1.2.3. Valorização e aplicações do soro de queijo .....	10
1.3. Bactérias lácticas .....	11
1.3.1. Caracterização .....	11
1.3.2. Principais bactérias lácticas.....	12
1.3.2.1. Género <i>Lactobacillus</i> .....	12
1.3.2.2. Género <i>Lactococcus</i> .....	13
1.3.2.3. Género <i>Streptococcus</i> .....	13
1.3.3. Fermentação láctica .....	14
1.3.3.1. Ácido láctico .....	14
1.3.4. Proteólise .....	16
1.3.4.1. Sistema proteolítico .....	16



1.3.4.2.	Péptidos bioativos .....	17
1.3.5.	Potencial antibacteriano do soro fermentado .....	19
2.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
2.1.	Espécies de bactérias utilizadas .....	21
2.1.1.	Identificação de bactérias lácticas .....	21
2.2.	Ensaio preliminares .....	22
2.3.	Ensaio fermentativos .....	22
2.3.1.	Desenvolvimento microbiano durante a fermentação .....	23
2.3.2.	Quantificação de lactose e ácido láctico .....	23
2.3.3.	Análise do perfil proteico.....	23
2.3.4.	Quantificação do teor de proteína total.....	24
2.3.5.	Análise da fração polipeptídica de baixo peso molecular .....	25
2.4.	Determinação das concentrações mínimas inibitórias em <i>L. monocytogenes</i> .....	25
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	26
3.1.	Ensaio preliminares .....	27
3.2.	Caracterização dos três tipos de soro .....	28
3.3.	Avaliação da capacidade fermentativa.....	30
3.4.	Avaliação da capacidade proteolítica .....	32
3.5.	Avaliação da atividade antibacteriana obtida através da fermentação .....	37
4.	CONCLUSÃO .....	41
5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Principais componentes do soro de queijo. (Adaptado de Jelen, 2011; Prazeres <i>et al.</i> , 2012).....	7
Tabela 2 – Principais proteínas do soro e suas características físico-químicas. (Adaptado de Madureira <i>et al.</i> , 2007).....	7
Tabela 3 – Composição dos principais tipos de soro em pó (% m/m). DWP – Soro desmineralizado, WPC – Concentrado proteico de soro, WPI – Isolado proteico de soro. (Adaptado de Jelen, 2011) .	11
Tabela 4 – Espécies de <i>Lactobacillus</i> , associadas à indústria dos laticínios, agrupadas por tipo de fermentação láctica. (Adaptado de De Angelis e Gobbetti, 2011) .....	13
Tabela 5 – Isômeros do ácido láctico produzidos, pelas principais espécies de bactérias lácticas. (Adaptado de Panesar <i>et al.</i> , 2007) .....	15
Tabela 6 – Atividade e origem dos péptidos bioativos do leite. (Adaptado de Pellegrini <i>et al.</i> , 1999; Chatterton <i>et al.</i> , 2006; Choi <i>et al.</i> , 2012) .....	18
Tabela 7 – Parâmetros físico-químicos do soro de vaca, cabra e ovelha, antes da fermentação. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3) ± desvio padrão (DP). Para cada coluna, os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente (p > 0,05) entre si. ....	28
Tabela 8 - Concentrações mínimas inibitórias (MICs) do ácido láctico e das frações polipeptídicas de baixo peso molecular, isoladas das amostras diárias dos três tipos de soro, ao longo da fermentação. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3). O hífen (-) representa a ausência de inibição. ....	37
Tabela 9 – Concentrações de ácido láctico, nos três tipos de soro, fermentado ao longo das 144 horas. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3). ....	38
Tabela 10 - Concentrações da fração de baixo peso molecular, nos três tipos de soro, fermentado ao longo das 144 horas. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3). ...	40

## Índice de figuras

Figura 1 – Diagrama de fabrico de queijo. (Adaptado de Jalen, 2011) .....	5
Figura 2 – Evolução da produção de queijo e quantidade de soro produzida estimada, a nível mundial, no intervalo de 2000 a 2012. (Fonte: FAO, 2014).....	6
Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de ação de um ácido orgânico, em células microbianas. (Adaptado de Mani-López <i>et al.</i> , 2012) .....	15
Figura 4 – Representação esquemática das CEPs de diferentes espécies de bactérias lácticas. C – citoplasma, M – membrana, PC – parede celular, AN – domínio âncora, W – domínio espaçador, H – domínio em hélice, B – domínio B, A – domínio A, PR – domínio catalítico, I – domínio modulatório, PP – pró-domínio. (Adaptado de Siezen, 1999) .....	17
Figura 5 – Evolução do pH e produção de ácido láctico, durante a fermentação do soro de mistura. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3) ± DP. ....	27
Figura 6 - Perfil proteico do soro de mistura, ao longo da fermentação, obtidos por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 17,5% (m/v), com 10% de glicerol. 0 – Leite de mistura, 1 – Soro de mistura, 2 a 7 – Dias 1 a 6 de fermentação. M – Marcador de peso molecular. ....	28
Figura 7 – Exemplo do perfil polipeptídico dos três tipos de soro: bovino (1), caprino (2) e ovino (3), obtido por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 17,5% (m/v), com 10% de glicerol. Algumas das principais proteínas do soro estão identificadas. M – Marcador de peso molecular. ....	29
Figura 8 – Evolução do crescimento microbiano e pH, nos três tipos de soro, durante a fermentação com <i>L. lactis</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. plantarum</i> . Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3) ± DP.....	31
Figura 9 - Evolução das concentrações de lactose e ácido láctico, nos três tipos de soro, durante a fermentação com <i>L. lactis</i> , <i>L. casei</i> e <i>L. plantarum</i> . Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3) ± DP.....	32
Figura 10 - Perfil polipeptídico dos três tipos de soro, fermentado com <i>L. lactis</i> (A), <i>L. casei</i> (B) e <i>L. plantarum</i> (C), durante as 144 horas, obtido por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 17,5% (m/v), com 10% de glicerol. Os números representam os dias da fermentação. M – Marcador de peso molecular. ....	34
Figura 11 - Evolução da hidrólise da $\alpha$ -lactalbumina (ALA) e da $\beta$ -lactoglobulina (BLG), nos três tipos de soro, durante a fermentação com <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Lactobacillus plantarum</i> . Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3) ± DP.....	36

## Lista de abreviaturas

ALA –  $\alpha$ -lactalbumina

BLG –  $\beta$ -lactoglobulina

BSA – *Bovine serum albumin*

CBO – Carência bioquímica de oxigênio

CEP – *Cell-envelope protease*

CQO – Carência química de oxigênio

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FDA – *Food and Drug Administration*

GRAS – *Generally recognized as safe*

HAMLET – *Human  $\alpha$ -lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells*

HPLC – *High Precision Liquid Chromatography*

Ig – Imunoglobulina

LF – Lactoferrina

LMW – *Low Molecular Weight*

LP – Lactoperoxidase

CMI – Concentração mínima inibitória

MWCO – *Molecular Weight Cut-off*

SA – *Serum albumin*

SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*

UFC – Unidade formadora de colônia

## Enquadramento

A indústria queijeira gera uma quantidade significativa de soro, dado que aproximadamente 89% do leite utilizado para o fabrico de queijo é transformado em soro. De um modo geral, cada quilograma de queijo produzido, origina cerca de 9 litros de soro. A nível mundial, são produzidas anualmente 40 milhões de toneladas de soro, pelo que a sua elevada carência química de oxigénio o torna num problema significativo de poluição ambiental, sendo importante encontrar alternativas para a sua utilização, minimizando o seu impacto ambiental.

Assim, devido às suas excelentes propriedades funcionais e nutricionais, é hoje considerado um produto de valor acrescentado, podendo ser usado no fabrico de requeijão, para a alimentação animal, na produção de lactose, galactose, glucose e ácido orgânicos (e.g. ácido láctico e ácido acético), ou como constituinte de fórmulas dietéticas, farmacêuticas ou cosméticas.

Durante as últimas década, diversos estudos abriram as portas para uma nova área de pesquisa, tendo como base o isolamento e a utilização de componentes específicos do soro de leite, que apresentaram vários tipos de bioatividades importante para a saúde humana. As proteínas do leite, por exemplo, são atualmente reconhecidas como uma das maiores fontes de péptidos bioativos de interesse nutricional, sendo que algumas, como é o caso da  $\beta$ -lactoglobulina e da  $\alpha$ -lactalbumina, são alergénicas. Estes péptidos são libertados através da proteólise das proteínas do soro, quer esta seja durante o processamento alimentar ou durante o processo digestivo, sendo que alguns estudos sugerem que os péptidos bioativos podem apresentar propriedades antibacterianas. Por outro lado, tem também sido demonstrada a capacidade antimicrobiana do ácido láctico produzido, durante a fermentação por bactérias, apresentando assim um elevado potencial como agente desinfetante e conservante. No entanto, a maioria dos estudos desta área focam-se apenas nos péptidos derivados das caseínas, provavelmente devido ao facto de as proteínas do soro do leite, sobretudo a  $\beta$ -lactoglobulina, serem bastante resistentes à proteólise. De facto, tentativas anteriores de hidrolisar estas proteínas, utilizando fermentações de soro bovino curtas (24 a 48 horas), recorrendo a bactérias lácticas comumente empregadas na indústria dos lacticínios, foram pouco frutíferas.

É plausível que uma fermentação adicional do soro, que estimule a produção de ácido láctico e de produtos resultantes da proteólise, possa originar diferentes tipos de propriedades de interesse comercial ou medicinal, tais como atividades antibacteriana - sobretudo se forem utilizados diferentes tipos de soro, com teor proteico variado. É igualmente possível que diferentes espécies bacterianas, menos utilizadas na produção de queijo e com atividades proteolíticas diferentes, consigam induzir uma maior degradação proteica e, consequentemente, uma maior bioatividade. Por outro lado, uma vez que a constituição do soro pode diferir entre espécies, é ainda plausível que a utilização de soros provenientes do fabrico de queijo, com leite de outros ruminantes (i.e. de origem caprina e ovina) possa permitir ataques proteolíticos diferentes, dentro da mesma espécie.

Deste modo, foi estudado o efeito da fermentação com bactérias lácticas que não são tipicamente utilizadas nestes trabalhos, em três tipos diferentes de soro de queijo – vaca, cabra e ovelha –, na produção de polipéptidos bioativos e ácido láctico, bem como o efeito proteolítico destas bactérias na hidrólise das principais proteínas do soro ( $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina).

Assim, os objetivos do trabalho foram: a) avaliar e comparar o potencial fermentativo de 3 espécies de bactérias lácticas, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*, ao longo do tempo, em soros de diferentes tipos de ruminantes, analisando a produção de ácido láctico e consequente consumo de lactose; b) analisar a capacidade de proteólise das diferentes bactérias lácticas em relação às proteínas do soro  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina; c) avaliar o potencial antibacteriano do ácido láctico e das frações polipeptídicas de baixo peso molecular, obtidas durante a fermentação com cada uma das espécies; e d) identificar as melhores espécies e os melhores tempos de fermentação para a obtenção de maiores níveis de ácido láctico, maior degradação das proteínas alergénicas e formação de polipéptidos com atividade antibacteriana.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## **1.1. A indústria do queijo**

### **1.1.1. Aspetos económicos**

Em termos de volume, a indústria do queijo é a mais relevante ao nível do fabrico de produtos fermentados (Hutkins, 2006a). Segundo a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO), a produção de queijo aumentou em cerca de 4 milhões de toneladas (mais 24%), desde o ano 2000 até 2012, sendo os três principais produtores os Estados Unidos da América (5 milhões de toneladas), a Alemanha (2 milhões de toneladas) e França (2 milhões de toneladas). Neste período de tempo, dos 753 milhões de toneladas de leite produzidos, a nível mundial, cerca de 15% foi utilizada para a produção dos 21 milhões de toneladas de queijo (FAO, 2014). Só em Portugal, no ano de 2014, cerca de 20% da produção total de leite (2 milhões de toneladas) foi utilizada para produzir 74 mil toneladas de queijo (FAO, 2014).

### **1.1.2. Processo de fabrico**

Embora existam diversos tipos de queijo, o processo de fabrico deste produto é relativamente semelhante para todos eles, envolvendo a transformação de uma matéria-prima líquida, num produto final sólido, através da precipitação das proteínas (Hutkins, 2006a).

No fabrico do queijo (Figura 1), o leite é inicialmente submetido a uma série de operações de tratamento e standardização que variam consoante a composição físico-química do leite e com o tipo de produto final pretendido. Após ter sido ou não tratado termicamente, o leite é transferido para as cubas onde é convertido em coalho, por um processo de coagulação que envolve a precipitação das principais proteínas do leite – as caseínas – formando assim um gel. Estas proteínas, que representam cerca de 80% da fração proteica do leite, são, na grande maioria dos queijos, praticamente as únicas proteínas presentes (Hutkins, 2006a). A etapa de coagulação pode ser realizada de diversas maneiras: (i) por adição de bactérias lácticas, que acidificam o meio até se atingir um valor de pH de 4,6, correspondente a ponto isoelétrico da caseína; (ii) por adição de quimosina, que hidrolisa a ligação peptídica entre um resíduo de metionina e de fenilalanina, da sub-unidade  $\kappa$  da caseína, o que resulta numa precipitação, onde é necessária a intervenção de iões cálcio; ou (iii) por combinação de acidificação moderada (pH 5,2) e aquecimento a 90 °C, o que resulta na desnaturação da caseína, mas também de outras proteínas.



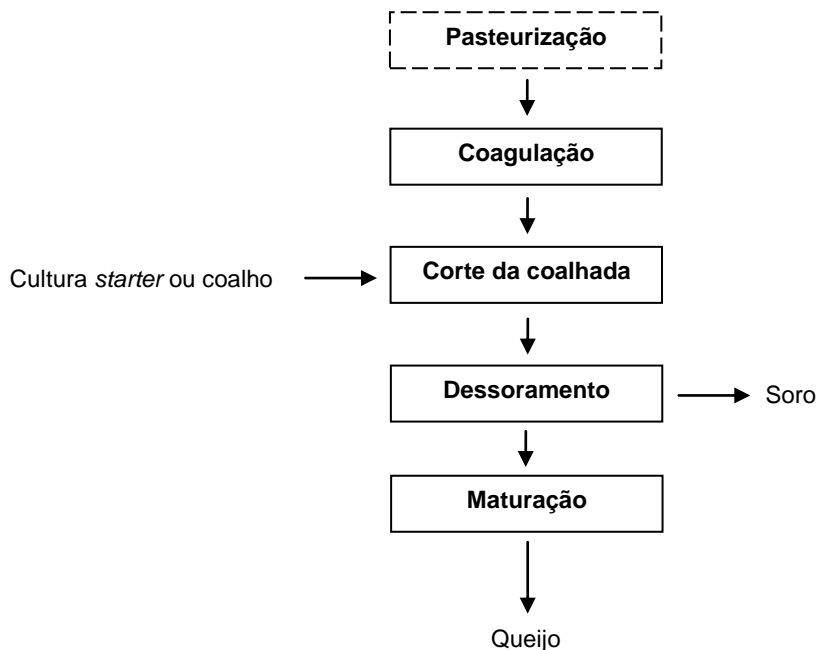


Figura 1 – Diagrama de fabricação de queijo. (Adaptado de Jelen, 2011)

Seguidamente, a coalhada é cortada, o que facilita o processo de sinérese, no qual é expelido um líquido, denominado de soro, contendo os constituintes que não foram aproveitados para o fabrico do queijo. A coalhada cortada é enformada e pressionada, de modo a remover o restante soro que ficou retido, sendo de seguida submetida a um processo de maturação, ou não, consoante o tipo de queijo pretendido.

Assim, uma vez que o queijo é, na sua maioria, composto por caseínas e por gordura, o seu rendimento do processo é muito baixo - cerca de 11% - sendo por isso necessários cerca de 9 L de leite para produzir 1 kg de queijo. Os restantes 89% formam o soro de queijo, do qual se falará adiante.

## 1.2. O soro de queijo

### 1.2.1. Caracterização geral

O soro é o principal sub-produto da indústria do queijo (Smithers, 2008). Em termos quantitativos, a quantidade de soro produzida, a nível mundial, no intervalo entre os anos de 2000 a 2012, acompanha a tendência da produção de queijo no mesmo período de tempo, ou seja, cerca de 1,7% ao ano (Figura 2). Em 2012, a quantidade de soro produzido foi de 170 milhões de toneladas, o valor mais alto do período de tempo considerado.

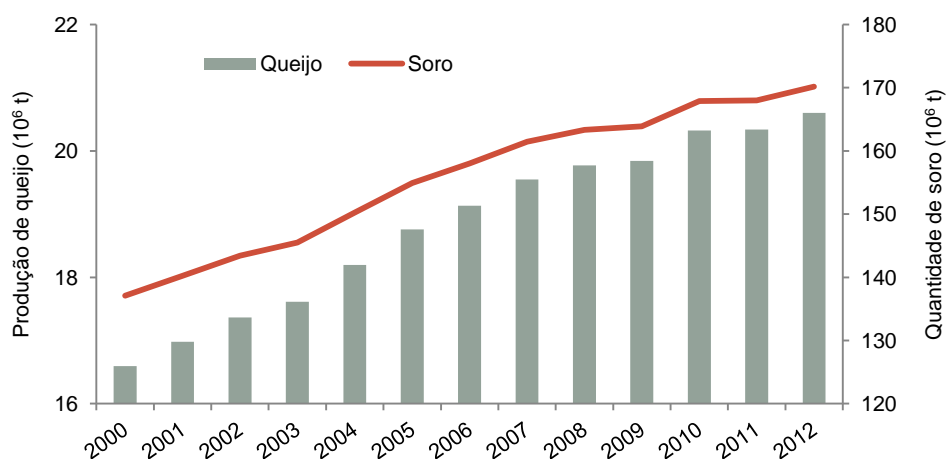


Figura 2 – Evolução da produção de queijo e quantidade de soro produzida estimada, a nível mundial, no intervalo de 2000 a 2012. (Fonte: FAO, 2014)

Este líquido, que representa 85 a 95% do volume de leite inicial e que retém cerca de 55% dos seus nutrientes, pode ser definido como a parte aquosa do leite que resta, após a coagulação das proteínas. No caso de a coagulação ser realizada por ação do pH, o soro resultante denomina-se por soro “ácido”, e quando é realizada por ação de enzimas proteolíticas, o soro resultante é denominado como soro “doce” (Panesar *et al.*, 2007). Apesar de os dois tipos de soro resultarem de tecnologias diferentes, ambos possuem composições semelhantes, sendo o principal componente a água (93 a 94 %), seguida da lactose (4,6 a 6,2 %) e das proteínas (0,6 a 1 %) (Tabela 1). Contudo, o soro “ácido” possui um teor de lactose mais baixo, pois a coagulação é realizada à custa da produção de ácidos orgânicos, nomeadamente ácido láctico, resultante da utilização da lactose pelos microrganismos (Jelen, 2011). Também a nível dos constituintes minerais existem diferenças, uma vez que o soro “ácido” possui um teor de cálcio maior, dado o fosfato de cálcio, presente nas micelas de caseína, se tornar solúvel, a pH baixo, passando para a fração do soro (Jelen, 2011).

Devido ao elevado volume produzido, bem como à sua composição rica em matéria orgânica, nomeadamente lactose e proteínas, o soro de queijo representa um importante problema ambiental (Prazeres *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013;). A nível de parâmetros físico-químicos, este produto apresenta valores de carência biológica de oxigénio (CBO) entre os 27 e os 60 g.L<sup>-1</sup> e valores de carência química de oxigénio (CQO) no intervalo entre os 50 e os 102 g.L<sup>-1</sup>, dando origem a um elevado consumo de oxigénio nos efluentes recetores (Carvalho *et al.*, 2013).

Tabela 1 – Principais componentes do soro de queijo. (Adaptado de Jelen, 2011; Prazeres *et al.*, 2012)

	Soro “doce” (% m/v)	Soro “ácido” (% m/v)
Sólidos totais	6,3 – 7	6,3 – 7
Lactose	4,6 – 6,2	4,4 – 4,6
Proteína	0,6 – 1	0,6 – 0,8
Ácido láctico	0,2	0,64
Cálcio	0,04 – 0,06	0,12 – 0,16
Fósforo	0,1 – 0,3	0,2 – 0,45

### 1.2.2. Caracterização proteica

Como referido anteriormente, o leite possui duas frações proteicas distintas, que durante o fabrico do queijo se dissociam, ficando a fração caseínica retida e sendo as restantes proteínas lixiviadas no soro. Estas proteínas, doravante denominadas como proteínas do soro, são moléculas globulares, com uma estrutura secundária predominantemente constituída por hélices  $\alpha$  (Madureira *et al.*, 2010). As principais proteínas que compõem este grupo são, por ordem de abundância, a  $\beta$ -lactoglobulina (BLG), a  $\alpha$ -lactalbumina (ALA), as imunoglobulinas (Ig), a albumina do soro (SA), a lactoferrina (LF) e a lactoperoxidase (LP), bem como outros compostos proteicos menos abundantes, tais como o glicomacropéptido (Madureira *et al.*, 2007; Madureira *et al.*, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2 – Principais proteínas do soro e suas características físico-químicas. (Adaptado de Madureira *et al.*, 2007)

Proteína	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Peso molecular (kDa)	Resíduos de aminoácidos
$\beta$ - lactoglobulina	1,3	18	162
$\alpha$ – lactalbumina	1,2	14	123
Imunoglobulinas	0,7	25 (cadeia leve) + 50 – 70 (cadeia pesada)	Variável
Albumina do soro	0,4	66	582
Lactoferrina	0,1	80	690
Lactoperoxidase	0,03	70	612

#### 1.2.2.1. $\beta$ -lactoglobulina

A  $\beta$ -lactoglobulina é a proteína dominante no soro, representando mais de metade do conteúdo proteico do mesmo (Kontopidis *et al.*, 2004; Madureira *et al.*, 2010; Creamer *et al.*, 2011). Esta proteína é sintetizada nas glândulas mamárias da maior parte dos mamíferos, estando ausente em algumas espécies, nomeadamente nas pertencentes aos grupos dos roedores e dos lagomorfos e no Homem (Kontopidis *et al.*, 2004). Possui diversas variantes, sendo a mais comum a  $\beta$ -lactoglobulina -A (Madureira *et al.*, 2007; Creamer *et al.*, 2011). Esta proteína é constituída por uma cadeia polipeptídica única, composta por 162 aminoácidos, conferindo-lhe uma massa molecular de 18 kDa, na sua forma nativa (Farrell *et al.*, 2004; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Dependendo do pH, esta proteína pode apresentar diferentes estruturas quaternárias, sendo encontrada sob a forma de octómero (pH entre 5,2 e 3,5), monómero (pH abaixo de 3 e acima de 8), mas mais comumente sob a forma dimérica (entre pH 7 e 5,2) (Madureira *et al.*, 2007). Contudo, a temperatura e as condições iónicas do meio contribuem para a alteração da estrutura quaternária da  $\beta$ -lactoglobulina (Ribadeau-Dumas e Grappin, 1989).

Esta proteína pertence à família das lipocalinas, proteínas extracelulares com capacidade para se ligarem a moléculas pequenas e hidrofóbicas, como o retinol e ácidos gordos, entre outras (Flower, 1996). A sua função concreta ainda não foi descoberta, mas dada a sua concentração no leite (2 a 3 g.L<sup>-1</sup>, no leite de vaca) e o facto de ser altamente resistente a proteólise, bem como a baixos valores de pH, pensa-se que a  $\beta$ -lactoglobulina pode ser importante no desenvolvimento dos recém-nascidos, nomeadamente ao nível de transporte de retinol e no metabolismo de ácidos gordos (Pérez e Calvo, 1995).

Uma vez que esta proteína não é produzida pelo organismo humano, é possível que alguns indivíduos apresentem reações alérgicas, aquando da ingestão desta proteína. De facto, existem casos clínicos reportados de reações alérgicas a esta proteína, como é o caso do relatório publicado em 1996, por Gall *et al.*, em que uma paciente mostrou sinais de alergia ao leite de ovelha, possivelmente devido à presença da  $\beta$ -lactoglobulina e da  $\alpha$ -lactalbumina. No mesmo ano, Docena *et al.*, num estudo em que se analisaram a alergenicidade das proteínas do leite, chegaram à conclusão que, apesar de a caseína ser o principal alérgeno do leite, a  $\beta$ -lactoglobulina possui um grau de alergenicidade elevado.

Contudo, a proteína na sua forma nativa possui diversas atividades biológicas, que podem beneficiar a saúde do consumidor, como por exemplo os efeitos anticarcinogénico e hipocolesterolémico, exercendo também influência a nível do metabolismo dos ácidos gordos e na proteção do organismo contra patógenos (Chatterton *et al.*, 2006). Através da hidrólise com enzimas digestivas (e.g. pepsina e tripsina) ou com outras enzimas comerciais, certas sequências peptídicas podem ser libertadas e exercer certo tipo de bioatividades, nomeadamente efeito hipotensor, atividade antibacteriana, efeito antiviral e efeito opióide (Chatterton *et al.*, 2006). Em termos da atividade antibacteriana, os resultados de Pellegrini *et al.* (2001) mostraram que a atividade bactericida dos

fragmentos de  $\beta$ -lactoglobulina foi mais elevada em relação às bactérias Gram-positivas estudadas, sendo praticamente nula nas bactérias Gram-negativas.

#### **1.2.2.2. $\alpha$ -lactalbumina**

A  $\alpha$ -lactalbumina é a segunda proteína mais importante no soro, a nível quantitativo, representando cerca de 20% do teor proteico total (Madureira *et al.*, 2007). Possui 123 resíduos de aminoácidos, o que lhe confere uma massa molecular de 14 kDa (Brew, 2011), e é inteiramente sintetizada nas glândulas mamárias, onde exerce a sua atividade, integrando o processo de síntese da lactose, em conjunto com a galactosiltransferase (Permyakov e Berliner, 2000). Embora a sua sequência possua um grau elevado de homologia com a família das lisozimas, a  $\alpha$ -lactalbumina possui um ião  $\text{Ca}^{2+}$  que intervém na manutenção da estrutura da proteína, bem como na sua função (Brew, 2011). Contudo, quando os valores de pH do meio são baixos (cerca de 3,5), o ião  $\text{Ca}^{2+}$  é libertado por uma alteração reversível da conformação da proteína (Permyakov e Berliner, 2000). Embora estas mudanças de conformação sejam reversíveis, o efeito da temperatura pode levar nalguns casos à desnaturação completa e irreversível desta proteína (Ribadeau-Dumas e Grappin, 1989).

A nível da sequência de aminoácidos, o grau de homologia entre as proteínas humana e bovina é de cerca de 76% (Chatterton *et al.*, 2006). Contudo, o caso clínico reportado por Gall *et al.* (1996) mostra que a  $\alpha$ -lactalbumina de leite de ovelha desencadeia respostas imunitárias em alguns indivíduos, provando ser alergénica.

Também a hidrólise enzimática desta proteína pode levar à libertação de sequências peptídicas bioativas, com diversas funcionalidades, de entre as quais se destacam o efeito hipotensor, o efeito opióide e o efeito bactericida (Chatterton *et al.*, 2006). No que toca a este último, Pellegrini *et al.* (1999) descobriram que, após digestão da  $\alpha$ -lactalbumina, com tripsina e quimiotripsina, diferentes péptidos antibacterianos foram libertados, tendo estes apresentado maior atividade contra bactérias Gram-positivas, do que contra bactérias Gram-negativas.

Foi igualmente descoberto que um complexo molecular constituído por  $\alpha$ -lactalbumina parcialmente desnaturada e ácido oleico, denominado HAMLET (*Human  $\alpha$ -lactalbumin Made Lethal to Tumor Cells*), possui a capacidade de induzir a apoptose em células cancerígenas (Hallgren *et al.*, 2008).

#### **1.2.2.3. Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas (Igs) são um grupo de proteínas, presente no leite e colostro de todas as espécies de mamíferos, cuja função biológica é da máxima importância para o recém-nascido. Estas proteínas são dos principais elementos que conferem proteção contra agentes patogénicos e toxinas, tanto para o recém-nascido, como para as glândulas mamárias, estando subdivididas em três classes: IgA, IgG e IgM (Marnila e Korhonen, 2011). Em termos de estrutura, as imunoglobulinas são moléculas formadas por quatro cadeias de polipéptidos: duas, denominadas leves, com peso molecular de cerca de 25 kDa, e outras duas, denominadas pesadas, com peso molecular entre 50 a 70 kDa (Madureira *et al.*, 2007).

#### **1.2.2.4. Albumina do soro**

Embora esta proteína seja predominantemente encontrada no sistema circulatório, é também encontrada no leite, dado que a sua passagem se dá através dos capilares sanguíneos (Wynn *et al.*, 2011). Possui 582 resíduos de aminoácidos, que lhe conferem um peso molecular de cerca de 66 kDa, e devido ao seu tamanho e estrutura complexa, tem a capacidade de se ligar a ácidos gordos e outros lípidos (Madureira *et al.*, 2007). Esta proteína já foi reportada como estando na base de algumas reações alérgicas ao leite bovino, bem como no desenvolvimento de *diabetes mellitus* (Wynn *et al.*, 2011).

#### **1.2.2.5. Lactoferrina**

A lactoferrina é uma glicoproteína monomérica, com capacidade de formar ligações com átomos de ferro, sendo a sua principal função o transporte deste elemento (Madureira *et al.*, 2007). Esta proteína é formada por uma cadeia de 690 resíduos de aminoácidos e, dependendo do nível de glicosilação e da espécie considerada, o seu peso molecular está compreendido entre os 80 e os 84 kDa (Korhonen e Marnila, 2011). Esta proteína possui também outras atividades, tais como atividade antimicrobiana nas glândulas mamárias e trato gastrointestinal e atividade antineoplásica (Korhonen e Marnila, 2011).

#### **1.2.2.6. Lactoperoxidase**

Esta proteína é a enzima mais abundante no leite, sendo a sua principal função, a de catalisar a oxidação de inúmeros compostos orgânicos, pelo peróxido de hidrogénio (Ribadeau-Dumas e Grappin, 1989), bem como do tiocianato, o que leva à produção de um composto antibacteriano, o hipotiocianato (Björck *et al.*, 1975; Ribadeau-Dumas e Grappin, 1989). A lactoperoxidase é constituída por 612 resíduos de aminoácidos, que lhe conferem um peso molecular de 70 kDa a 78 kDa, dependendo do seu nível de glicosilação (Kussendrager e van Hooijdonk, 2000).

### **1.2.3. Valorização e aplicações do soro de queijo**

Durante muito tempo, o soro de queijo foi considerado como um resíduo que a indústria tinha de eliminar, da forma mais económica possível, dada a sua reduzida valorização. Assim, métodos como a descarga direta no meio ambiente ou no sistema de esgotos e a utilização como matéria-prima para a alimentação animal, foram as principais aplicações encontradas pela indústria, para este subproduto (Smithers, 2008). Contudo, dados os avanços científicos e a criação de leis mais limitantes, a nível ambiental, o soro passou a ser encarado como um subproduto potencialmente valorizável, ao invés de um resíduo sem utilidade.

A forma mais antiga de valorização do soro é a utilização deste como matéria-prima para a produção de queijos, dos quais existem dois tipos diferentes: (i) os queijos tipo *Ricotta*, conhecidos em todo o mundo e do qual faz parte o Requeijão português, que são produzidos com base no princípio da coagulação das proteínas do soro, através do aquecimento a uma temperatura igual ou superior a

90 °C, durante poucos minutos; e (ii) os queijos tipo *Mysost*, que são produzidos através da evaporação da água do soro (Jelen, 2011).

Outras formas de valorização do soro envolvem a sua secagem e transformação em pó. Dependendo do pré-tratamento efetuado ao soro, estes produtos diferem na sua composição em termos de lactose e proteínas (Tabela 3). No entanto, com os avanços nas tecnologias de membranas, como a micro- ou a ultrafiltração, foi possível desenvolver ingredientes ricos em proteínas e com um teor de gordura reduzido, tais como os concentrados de proteína (WPC), com um teor de 80% de proteína, ou os isolados de proteínas (WPI), com um teor de 85 a 90% de proteína (Smithers, 2008).

Tabela 3 – Composição dos principais tipos de soro em pó (% m/m). DWP – Soro desmineralizado, WPC – Concentrado proteico de soro, WPI – Isolado proteico de soro. (Adaptado de Jelen, 2011)

Produto	Proteína total	Lactose	Minerais
Soro em pó	12,5	73,5	8,5
DWP (90%)	15	83	1
Permeado de soro	1	90	9
WPC	65 – 80	4 – 21	3 – 5
WPI	88 – 92	<1	2 - 3

Uma vez que o soro de queijo possui teores de lactose e de proteínas elevados, a sua valorização biotecnológica, como substrato fermentativo, tem vindo a ser explorada, nomeadamente para a produção de bioetanol, biogás e ácido láctico (Smithers, 2008; Comino *et al.*, 2012; Ariyanti *et al.*, 2014). Para além disso, algumas empresas utilizam o soro como meio de propagação de bactérias lácticas, utilizadas no processo de produção do queijo (Jelen, 2011).

Atualmente têm sido desenvolvidos estudos para o desenvolvimento de um novo conjunto de produtos: as bebidas à base de soro (Magalhães *et al.*, 2010; Pescuma *et al.*, 2010).

### 1.3. Bactérias lácticas

#### 1.3.1. Caracterização

As bactérias lácticas são microrganismos geralmente associados a fermentações de alimentos, sendo por isso encontrados em diversos nichos ecológicos, principalmente alimentos vegetais e animais fermentados (Booyse *et al.*, 2002; Adnan e Tan, 2007; Hwanhlem *et al.*, 2011), mas também no leite (Martín *et al.*, 2003) e trato gastrointestinal humano (Rubio *et al.*, 2014). Este grupo de microrganismos é considerado benéfico, uma vez que vários trabalhos apontam para o seu potencial probiótico

(Monteagudo-Mera *et al.*, 2012; Argyri *et al.*, 2013; García-Ruiz *et al.*, 2014;), isto é, quando consumidos em doses adequadas, conferem benefício ao hospedeiro (Sanders, 2008). Estes organismos estão descritos como exercendo um efeito positivo ao nível da saúde gastrointestinal, do sistema imunitário, dos efeitos antimutagénicos e anticarcinogénicos ou dos efeitos antihipertensores (Argyri *et al.*, 2013; Butel, 2014).

As bactérias lácticas são um grupo de bactérias Gram positivas, catalase e oxidase negativas, não esporuladas, estritamente fermentativas, mas aerotolerantes, cujo principal produto do metabolismo dos açúcares é o ácido láctico (Bjorkroth e Koort, 2011; von Wright e Axelsson, 2012). Podem ser consideradas como microrganismos meso- ou termófilos, com temperaturas ótimas (dependendo da espécie) entre os 30 e 42 °C, sendo bastante tolerantes a ambientes ácidos (Hutkins, 2006; von Wright e Axelsson, 2012). Este é o grupo de bactérias mais importante a nível industrial, nomeadamente ao nível das culturas *starter*, sendo principalmente utilizadas na fermentação de lacticínios (Hutkins, 2006).

### **1.3.2. Principais bactérias lácticas**

#### **1.3.2.1. Género *Lactobacillus***

Trata-se do maior género de bactérias lácticas, compreendendo mais de uma centena de espécies, muitas delas com um papel de destaque na indústria dos lacticínios, como *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii bulgaricus* ou *L. plantarum* (De Angelis e Gobbetti, 2011; Barrangou *et al.*, 2012). São bastonetes Gram positivos, microaerofílicos, que podem ser encontrados em diversos nichos ecológicos, de entre os quais o corpo humano (Barrangou *et al.*, 2012). Estas bactérias são utilizadas como culturas *starter* e probióticas, uma vez que produzem rapidamente uma grande quantidade de ácido láctico, levando ao decréscimo do pH; são reconhecidas como sendo detentoras de um estatuto GRAS (*Generally Recognized as Safe*); sintetizam bacteriocinas e exopolissacáridos; e contribuem para a aromatização de vários produtos, devido à produção de acetaldeído e diacetil (De Angelis e Gobbetti, 2011).

A nível metabólico, este género pode ser dividido em três grupos distintos, consoante o seu metabolismo dos açúcares: homofermentativos obrigatórios, heterofermentativos obrigatórios e heterofermentativos facultativos (Tabela 4).

Este grupo produz diversos tipos de bacteriocinas (péptidos antimicrobianos sintetizados por diversas bactérias), como a lactocina e a caseicina (produzidas por *L. casei*) ou a plantaricina (produzida por *L. plantarum*) (Kawai e Saito, 2011; Lü *et al.*, 2014). Os pesos moleculares destes péptidos são variáveis sendo o da lactocina e da plantaricina inferior a 10 kDa e o da caseicina superior a 40 kDa (Kawai e Saito, 2011; Hu *et al.*, 2013; Lü *et al.*, 2014).



Tabela 4 – Espécies de *Lactobacillus*, associadas à indústria dos laticínios, agrupadas por tipo de fermentação láctica. (Adaptado de De Angelis e Gobbetti, 2011)

Heterofermentativos		
Homofermentativos	Facultativos	Obrigatórios
<i>L. acidophilus</i>	<i>L. casei</i>	<i>L. brevis</i>
<i>L. delbrueckii</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. buchneri</i>
subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. fermentum</i>
subsp. <i>lactis</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>L. kefir</i>
<i>L. helveticus</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. reuteri</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>L. sakei</i>	<i>L. parabuchneri</i>

#### 1.3.2.2. Gênero *Lactococcus*

Este gênero compreende bactérias mesofílicas, com morfologia cocóide, que podem ocorrer quer individualizadas, quer em cadeias (Mills e Ross, 2011; von Wright, 2012). Das 7 espécies que este gênero compreende, a mais importante a nível industrial é a *Lactococcus lactis*, sendo utilizadas as suas diferentes subespécies: *lactis*, *cremoris* e *lactis* biovar. *diacetylactis* (Mills e Ross, 2011). Estas subespécies diferem apenas na tolerância a concentrações salinas e à capacidade de metabolizar a arginina, sendo todas elas bactérias homofermentativas (von Wright, 2012). As suas funções a nível industrial mais significativas são o consumo da lactose, com consequente produção de ácido láctico; a produção de compostos aromáticos, derivada da degradação das proteínas do leite; e a produção de bacteriocinas, com propriedades antimicrobianas (Mills e Ross, 2011).

Este gênero é conhecido por produzir diversos tipos de bacteriocinas, nomeadamente a lacticina, a lactococcina, a lactociclina e a nisina (Zendo e Sonomoto, 2011). Esta última pode existir numa de três variantes (A, Z ou Q), de acordo com a sequência de aminoácidos, sendo já permitido o seu uso como aditivo alimentar em laticínios, enlatados e carnes curadas, em mais de 50 países (Tong *et al.*, 2014).

#### 1.3.2.3. Gênero *Streptococcus*

Das várias espécies que compõem este gênero, a mais relevante a nível alimentar é a *Streptococcus thermophilus*. A nível morfológico, estas bactérias apresentam-se sob a forma de cocos, dispondo-se em pares ou cadeias longas (Harnett *et al.*, 2011). A sua temperatura ótima está entre os 40 e os 45 °C, sendo por isso considerada como uma bactéria termofílica (Harnett *et al.*, 2011). Do ponto de vista industrial, esta espécie é utilizada para o fabrico de vários produtos, em conjunto com outras espécies de bactérias lácticas. Um destes produtos é o iogurte, que se baseia na fermentação do leite por parte de *S. thermophilus* e *L. delbrueckii bulgaricus*, por ação de uma interação mutualista entre estas duas bactérias. Neste processo, ambas as espécies se estimulam mutuamente, quer através da

produção de metabolitos secundários, quer da alteração do meio, nomeadamente pelo decréscimo do pH, sofrendo picos populacionais alternados (Siewverts *et al.*, 2008; Siewverts *et al.*, 2010).

Estas bactérias também são conhecidas por produzir diferentes tipos de bacteriocinas, nomeadamente a termofilina (Kabuki *et al.*, 2007).

### **1.3.3. Fermentação láctica**

A fermentação pode ser descrita como um processo de oxidação de hidratos de carbono e outros compostos semelhantes, que tem como principal resultado a produção de ácidos orgânicos, mas também de álcool e dióxido de carbono (Caplice e Fitzgerald, 1999). Tal como referido anteriormente, as bactérias lácticas são organismos estritamente fermentativos, dado não possuírem qualquer tipo de sistema respiratório, pelo que a única maneira de obterem energia é recorrendo à fermentação láctica (von Wright e Axelsson, 2012). Dependendo da espécie, esta fermentação pode ocorrer seguindo duas vias: a via homofermentativa, caso o ácido láctico seja o único produto final; ou a via heterofermentativa, caso haja produção de outros compostos, para além do ácido láctico, nomeadamente o ácido acético, o etanol e o dióxido de carbono (von Wright e Axelsson, 2012). Assim, o ácido láctico é o principal produto da fermentação láctica, por parte deste grupo de bactérias, tendo um papel importante como agente antimicrobiano nos alimentos fermentados.

#### **1.3.3.1. Ácido láctico**

Este ácido orgânico, principal produto da fermentação láctica, é conhecido pelo seu efeito antimicrobiano, quer em alimentos de origem animal, quer de origem vegetal (Akbas, 2007; Carpenter *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014). Devido ao seu estatuto *Generally Recognized as Safe* (GRAS), o ácido láctico está apto para ser adicionado a vários alimentos, estando legalmente autorizado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), como agente antimicrobiano, conservante, aromatizante e estabilizador de pH (21CFR184.1061).

Trata-se de um ácido monocarboxílico, com um pKa de 3,79, que pode ocorrer em duas formas isoméricas, a D(-) e a L(+) (Mani-López *et al.*, 2012). A Tabela 5 demonstra que, dependendo da espécie de bactéria láctica, pode ser produzido um ou ambos os isómeros. Em 2002, Leitch e Stewart concluíram que para diferentes estirpes de *E. coli* O157, o isómero L(+) possuía maior atividade antimicrobiana, do que o isómero D(-).

Tabela 5 – Isômeros do ácido láctico produzidos, pelas principais espécies de bactérias lácticas. (Adaptado de Panesar *et al.*, 2007)

Espécie	Isômero do ácido láctico
<i>L. acidophilus</i>	DL(±)
<i>L. delbrueckii bulgaricus</i>	D(-)
<i>L. casei</i>	L(+)
<i>L. plantarum</i>	DL(±)
<i>L. lactis</i>	L(+)
<i>S. thermophilus</i>	L(+)
<i>Leuconostoc</i> sp.	D(-)

Tal como se pode observar na Figura 3, a atividade antimicrobiana do ácido láctico tem por base a capacidade da sua forma não-dissociada penetrar a membrana celular, quando o pH do meio é ácido (Alakomi *et al.*, 2000; Mani-López *et al.*, 2012). Contudo, uma vez que o citosol possui valores de pH entre os 6 e os 7, a molécula do ácido dissocia-se, perturbando o funcionamento normal da célula. Esta perturbação é devida, por um lado, ao desequilíbrio do pH intracelular, o que leva ao consumo de elevados níveis de ATP de modo a combater a acumulação de iões  $H^+$ , bem como à acumulação de formas aniónicas, que são tóxicas para as células (Brul e Coote, 1999; Mani-López *et al.*, 2012). De acrescentar que o ácido láctico tem a capacidade de danificar as membranas celulares de patogénios, nomeadamente *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp., o que leva à libertação do conteúdo proteico e a alterações da estrutura intracelular (Wang *et al.*, 2015).

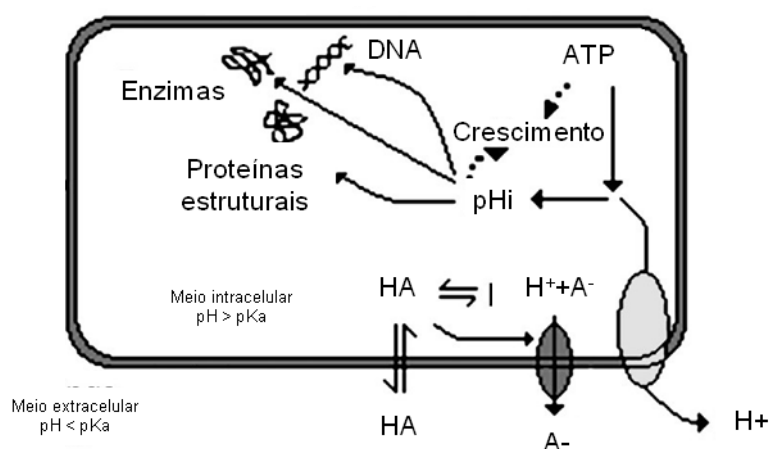


Figura 3 - Representação esquemática do mecanismo de ação de um ácido orgânico, em células microbianas. (Adaptado de Mani-López *et al.*, 2012)

Em bactérias Gram -, a membrana externa, rica em lipopolissacáridos, funciona como uma importante barreira permeável a moléculas pequenas e hidrofóbicas, mas impermeável a macromoléculas (e.g. enzimas e bacteriocinas) (Bolla *et al.*, 2011). Contudo, devido ao seu pequeno tamanho e elevada solubilidade, o ácido láctico tem a capacidade de penetrar esta barreira e atingir o espaço periplásmico, permeabilizando a membrana externa, devido à libertação dos lipopolissacáridos, o que potencia os efeitos de outras moléculas antimicrobianas, que não têm capacidade de penetração, tais como bacteriocinas e outros péptidos bioativos (Alakomi *et al.*, 2000).

#### **1.3.4. Proteólise**

Durante o processo fermentativo, o sistema proteolítico das bactérias lácticas tem um papel fundamental, pois permite que estes microrganismos adquiram os aminoácidos que lhes são essenciais, de modo a manter uma população viável. Para além disso, a degradação proteica e todo o conjunto de reações que envolve o catabolismo deste grupo de moléculas, é de grande importância para as características sensoriais dos produtos fermentados, uma vez que é responsável pelo desenvolvimento dos seus sabores característicos (Savijoki *et al.*, 2006). Um exemplo disto é a proteólise das caseínas, aquando da maturação de certos tipos de queijo, que leva a um desenvolvimento dos seus atributos organoléticos característicos, pois os seus aminoácidos são convertidos, pelas bactérias lácticas, em álcoois, aldeídos, ésteres, tióis e ácidos orgânicos (Smit *et al.*, 2005).

Este grupo de microrganismos é descrito como sendo exigente, a nível nutricional, especialmente no que diz respeito aos aminoácidos, uma vez que requerem entre seis a catorze aminoácidos essenciais (Christensen *et al.*, 1999). Assim, uma vez que o leite é o principal meio onde estas bactérias proliferam, e devido ao seu reduzido conteúdo de pequenos péptidos e aminoácidos livres, as bactérias lácticas têm de possuir um sistema proteolítico adequado à digestão das suas principais proteínas – as caseínas (Lopez-Kleine e Monnet, 2011).

##### **1.3.4.1. Sistema proteolítico**

O sistema proteolítico das bactérias lácticas é composto por três elementos principais, que atuam de modo sequencial: (i) as proteases, que hidrolisam as proteínas, produzindo péptidos; (ii) os transportadores de péptidos, que permitem a passagem destas moléculas para dentro da célula; e (iii) as peptidases intracelulares, que degradam os péptidos em moléculas de menores dimensões e aminoácidos, capazes de serem assimilados (Liu *et al.*, 2010).

A hidrólise das proteínas, nomeadamente das caseínas, é realizada por enzimas proteolíticas ancoradas na membrana, denominadas de *cell-envelope proteases* (CEPs), que possuem 5 a 6 domínios (Figura 4) (Savijoki *et al.*, 2006). Os domínios das CEP são: o pro-domínio, derivado do processamento da proteína; o domínio modulatório, que possivelmente modula a especificidade da enzima para o substrato; o domínio catalítico, que leva a cabo a reação enzimática; os domínios A e B, cuja função é ainda desconhecida, mas que se pensa intervirem na estabilização da atividade da

enzima; o domínio em hélice, cuja função é posicionar os domínios A e B fora da célula; e o domínio hidrofílico, que funciona como um espaçador inserido na membrana (Siezen, 1999). Até agora foram caracterizados 5 tipos diferentes destas proteínas (PrtP, PrtH, PrtR, PrtB e PrtS) e, regra geral, cada espécie de bactéria láctica possui, apenas um tipo (Savijoki *et al.*, 2006). Contudo, existem relatos de espécies que possuem mais do que um tipo destas enzimas, na sua parede celular (Stefanitsi, 1995).

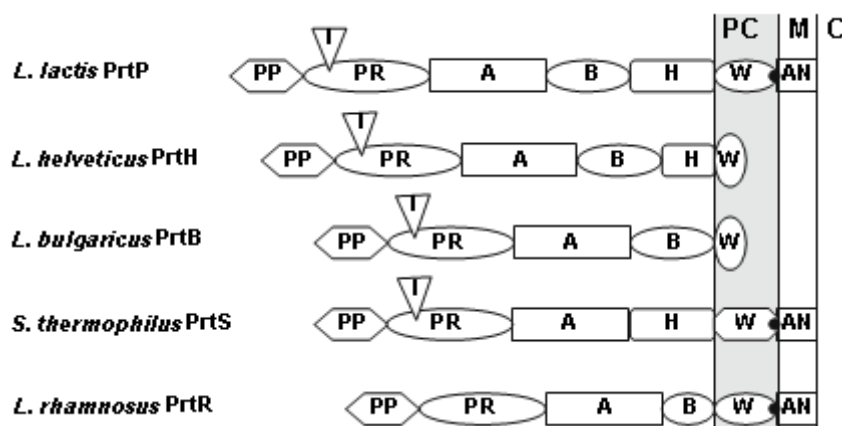


Figura 4 – Representação esquemática das CEPs de diferentes espécies de bactérias lácticas. C – citoplasma, M – membrana, PC – parede celular, AN – domínio âncora, W – domínio espaçador, H – domínio em hélice, B – domínio B, A – domínio A, PR – domínio catalítico, I – domínio modulatório, PP – pré-domínio. (Adaptado de Siezen, 1999)

Uma vez decorrida a hidrólise proteica, os fragmentos proteicos de menores dimensões estão prontos a serem assimilados pelas bactérias. Estas possuem um sistema de transporte para este tipo de moléculas, composto por transportadores específicos para oligopéptidos (4 a 35 resíduos de aminoácidos), denominados Opp, e transportadores específicos para di- ou tripéptidos, denominados Dpp (Doeven *et al.*, 2005). Ambos os tipos de transportadores são do tipo *ATP-binding cassette* (ABC), pelo que o transporte destas moléculas requer consumo de energia (Doeven *et al.*, 2005).

Já alguns estudos se focaram na hidrólise das principais proteínas do soro, através da fermentação com bactérias lácticas (Pescuma *et al.*, 2007; Pescuma *et al.*, 2008; Pescuma *et al.*, 2010). Contudo, estes trabalhos utilizam sempre as mesmas estirpes bacterianas, nomeadamente *L. acidophilus*, *L. delbrueckii bulgaricus*, *S. thermophilus*, nunca atingindo níveis elevados de proteólise das principais proteínas do soro –  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina.

#### 1.3.4.2. Péptidos bioativos

O papel das proteínas como nutriente funcional é já conhecido, desde há muito tempo. A grande maioria, que se encontra naturalmente presente nos alimentos, desempenha a sua ação fisiológica, quer diretamente, quer após sofrer hidrólise enzimática (Korhonen e Pihlanto, 2003). Estas moléculas são uma fonte de péptidos bioativos – fragmentos de proteínas que, enquanto são parte de uma sequência proteica maior, não possuem qualquer atividade, mas que após libertação têm um efeito fisiológico benéfico na saúde dos consumidores (Espitia *et al.*, 2012). Este assunto tem despertado o interesse da comunidade científica, particularmente na área alimentar e da nutraceutica, sendo que o

número de publicações com este tema aumentou para o dobro, no intervalo de tempo entre 2000 e 2012 (Sánchez-Rivera *et al.*, 2014).

Embora as origens dos péptidos bioativos sejam variadas, as proteínas do leite são a principal fonte destas moléculas (Korhonen e Pihlanto, 2003; Hafeez *et al.*, 2014). O número de péptidos bioativos conhecidos, provenientes de produtos láteos, nomeadamente hidrolisados proteicos e produtos fermentados, tem vindo a aumentar, sendo reconhecidos os seus efeitos antimicrobianos, imunomodulatórios, antihipertensores, anticolesterolémicos, antioxidantes, opióides e anticancerígenos (Tabela 6) (Choi *et al.*, 2012). Algumas das atividades, a nível fisiológico (e.g. antihipertensores, antitrombóticos), devem-se ao facto de estas moléculas possuírem um mecanismo de inibição de enzimas proteolíticas (Smacchi e Gobbetti, 2000).

Tabela 6 – Atividade e origem dos péptidos bioativos do leite. (Adaptado de Pellegrini *et al.*, 1999; Chatterton *et al.*, 2006; Choi *et al.*, 2012)

<b>Atividade</b>	<b>Origem</b>	<b>Nomenclatura</b>
Anti-hipertensora	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Casocininas
	$\alpha$ -lactalbumina	Lactocininas
	$\beta$ -lactoglobulina	
Antimicrobiana	Lactoferrina	
	$\alpha$ -Caseína	Lactoferricina B
	$\kappa$ -Caseína	Isracidina
	$\alpha$ -lactalbumina	Capacina
	$\beta$ -lactoglobulina	
Antitrombótica	$\kappa$ -Caseína	Casoplatelinas
Imunomodulatória	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	
	$\alpha$ -lactalbumina	Imunopéptidos
	$\beta$ -lactoglobulina	
Osteoprotetora	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Caseinofosfopéptidos
Opióide	$\alpha$ -, $\beta$ -Caseína	Casomorfina
	$\alpha$ -lactalbumina	$\alpha$ -lactorfina
	$\beta$ -lactoglobulina	$\beta$ -lactorfina
Anticancerígena	Lactoferrina	
	$\alpha$ -lactalbumina	
Antioxidante	Albumina do soro	
	Caseína	

Existem diversos métodos através dos quais se podem produzir este tipo de péptidos, sendo os mais comuns: (i) o recurso a proteínas digestivas (e.g. tripsina, pepsina), (ii) a atividade microbiana, durante a fermentação e (iii) a utilização de enzimas provenientes de microrganismos proteolíticos (Korhonen e Pihlanto, 2003b).

Como visto acima, as bactérias lácticas têm a capacidade de digerir as proteínas do leite, de modo a obter moléculas mais pequenas, capazes de serem assimiladas. Contudo, durante o processo metabólico, podem existir alguns péptidos bioativos que não são aproveitados e que permanecem no meio (Hafeez *et al.*, 2014). Devido ao seu mecanismo inibitório de enzimas proteolíticas, alguns destes fragmentos podem ter um efeito repressor no sistema proteolítico das bactérias lácticas, nomeadamente ao nível das endopeptidases (Gobbetti *et al.*, 1995), inibindo a sua atividade.

#### **1.3.5. Potencial antibacteriano do soro fermentado**

As aplicações do soro de leite na indústria alimentícia são diversas, devido ao seu elevado valor nutritivo. A fermentação do soro possui um elevado potencial para a indústria alimentar, na medida em que promove a remoção de proteínas alergénicas, e também da lactose. O efeito direto deste processamento é produção de ácido láctico, o que aumenta o tempo de prateleira do produto, graças à sua atividade antibacteriana.

No caso das proteínas do soro, desde há muito tempo que vários estudos se têm vindo a focar no isolamento de sequências polipeptídicas específicas com atividade antibacteriana, que podem ser utilizadas, tanto na indústria alimentar, como em medicina (e.g. antibióticos e nutracêuticos). Enquanto as proteínas na sua forma nativa, são aparentemente inativas (excetuando a lactoferrina e a lisozima), a sua hidrólise pode originar sequências polipeptídicas com efeito antimicrobiano (Clare e Swaisgood, 2000). Contudo, muitos dos estudos realizados neste âmbito, incidem maioritariamente sobre a atividade antimicrobiana dos produtos da hidrólise das caseínas (McCann *et al.*, 2006; Hayes *et al.*, 2006; Birkemo *et al.*, 2008). Em 1999, Pellegrini *et al.* isolaram e identificaram três fragmentos polipeptídicos da  $\alpha$ -lactalbumina, após digestão enzimática, com efeito bactericida. Recentemente, de modo a colmatar a falta de informação que existe em relação ao efeito antimicrobiano dos polipéptidos derivados de proteínas do soro, Théolier *et al.* (2013) desenvolveram um estudo onde foram testadas e encontradas atividades antibacterianas para sequências polipeptídicas provenientes da hidrólise de proteínas do soro.

Este tipo de moléculas funcionais está presente numa vasta gama de produtos láteos fermentados. Várias empresas exploraram o potencial benéfico destes péptidos, a diferentes níveis, sendo por isso já comercializados alguns produtos, por todo o mundo, que mencionando possuir este tipo de moléculas, afirmam trazer benefícios específicos para a saúde do consumidor.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS



## 2.1. Espécies de bactérias utilizadas

As bactérias lácticas utilizadas nos ensaios de fermentação foram: *Lactococcus lactis*, isolado neste trabalho, a partir de um fermento comercial; *Lactobacillus casei*, isolado neste trabalho, a partir de leite fermentado; e *Lactobacillus plantarum* (ISA 3960), proveniente da coleção microbiana do Instituto Superior de Agronomia. As culturas foram mantidas em meio MRS líquido (De Man, Rogosa e Sharpe: 52 g.L<sup>-1</sup>) (Biokar Diagnostics, França), ao qual, depois de esterilizado (121 °C, 15 minutos), foi adicionada L-cisteína (0,1 g.L<sup>-1</sup>) (Sigma-Aldrich, EUA).

Para os ensaios de determinação da Concentração Mínima Inibitória (MICs), foi utilizada a bactéria modelo *Listeria monocytogenes*, mantida em meio Tryptic Soy Agar – Yeast Extract (TSA-YE).

### 2.1.1. Identificação de bactérias lácticas

Inicialmente, os isolados foram submetidos a três testes fenotípicos (coloração de Gram, teste da catalase e teste da oxidase), sendo posteriormente identificados molecularmente, de modo a determinar a espécie.

Para a identificação molecular, foi realizada uma extração de DNA das bactérias utilizadas, crescidas em meio MRS, durante 24 h, a 30 °C, através do GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, EUA).

A amplificação de DNA foi efetuada numa mistura de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando os primers PA e PH, como descrito em Edwards *et al.*, 1989, com um volume total de 25 µL, contendo 0,4 µM de cada primer, 1mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 U de um mix de PCR NzyTaq 2x Colourless Master Mix, separate MgCl<sub>2</sub> (nzytech, Portugal) e 1 µL de DNA. A reação de PCR foi realizada num termociclador (Piko Thermal Cycler, Thermo Scientific, USA), consistindo numa desnaturação inicial de 5 minutos, a 94 °C, seguida de 30 ciclos de amplificação, cada qual contendo um passo de desnaturação de 30 segundos, a 94 °C, um passo de emparelhamento de 30 segundos, a 49 °C, e um passo de extensão de 1 minuto, a 72 °C. A reação foi finalizada com uma extensão de 5 minutos, a 72 °C, sendo realizado um arrefecimento até aos 4 °C. Foi utilizado como controlo positivo *Oenococcus oeni* ISA 4279 e como controlo negativo *Saccharomyces cerevisiae* ISA 1000.

Os produtos da reação de PCR foram observados utilizando a técnica de eletroforese em gel de agarose (Seakem LE Agarose, Lonza, USA), em presença de tampão TBE (45 mM Tris-HCl [Sigma-Aldrich, EUA], 45 mM de ácido bórico [Sigma-Aldrich, EUA] e 1 mM de EDTA [Sigma-Aldrich, EUA], pH 8). As amostras foram preparadas com 5 µL do produto de PCR, 2 µL de GelRed (Biotum, USA) e 2 µL de *loading dye* (NZYDNA, nzytech, Portugal). A corrida foi realizada durante 50 minutos, a uma voltagem constante de 80 V. Finalmente, o gel foi observado através de UV (GelDoc, BioRad, EUA), sendo as imagens obtidas, digitalizadas através do software Quantity One® (BioRad, USA).

O DNA amplificado foi sequenciado, pela STABvida (Setúbal, Portugal), utilizando o método de Sanger. As sequências foram analisadas através da plataforma nucleotide BLAST.

## 2.2. Ensaios preliminares

De forma a otimizar as condições de fermentação e uma vez que estudos realizados previamente, dentro do grupo de trabalho, com soro e mistura de cabra, vaca e ovelha mostraram uma elevada hidrólise das principais proteínas do soro, nomeadamente da  $\alpha$ -lactalbumina, optou-se por começar o trabalho com este soro de mistura (cedido pela empresa Queijo Saloio, Torres Vedras, Portugal). Este foi recolhido diretamente da fábrica, aquando da produção de queijo e, durante o processo de fabrico do queijo de mistura, foi utilizado um fermento industrial (Danisco, Dinamarca), composto por *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris*, *Lactococcus lactis lactis* biovar. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*.

Os ensaios fermentativos foram realizados em balões de Erlenmeyer de 2 L, durante 6 dias, a uma temperatura constante de 37 °C, sem agitação. O soro foi ainda inoculado com uma mistura de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*. De forma a acompanhar o processo fermentativo, foram retiradas amostras todos os dias, de modo a avaliar diversos parâmetros: i) o pH; ii) o teor proteico total; iii) o perfil proteico e iv) a quantidade de lactose e ácido láctico.

## 2.3. Ensaios fermentativos

Uma vez que com o soro de mistura se obtiveram resultados de proteólise e formação de péptidos bioativos interessantes, optou-se por realizar uma abordagem em que se utilizaram os três tipos de soro presentes na mistura, em fermentações paralelas. Assim foram utilizados: soro de vaca liofilizado, reconstituído a 4% (m/v) em água bidestilada (Milli-Q); soro de ovelha, proveniente de uma indústria de queijo de ovelha (DAMAR - Produtora de Queijos, Lda); e soro de cabra, proveniente de uma indústria de queijo (Queijo Saloio, Torres Vedras, Portugal). Os três tipos de soro foram diluídos, em água, de forma a obter um teor de lactose de 40 g.L<sup>-1</sup>, sendo posteriormente submetidos a três ciclos de tratamento térmico, durante 10 minutos, em banho termostaticado a 90 °C, seguido de incubação em estufa a 30 °C  $\pm$  2 °C, durante 48 horas.

Para a realização dos ensaios, os pré-inóculos foram crescidos em meio MRS líquido, durante 24 horas, a uma temperatura de 37 °C  $\pm$  2 °C. Findo o tempo de incubação, foi realizada uma leitura da absorvância a 600 nm, sendo de seguida adicionado o pré-inóculo de cada espécie, a cada um dos três tipos de soro, de modo a obter uma concentração celular constante de 10<sup>6</sup> UFC.mL<sup>-1</sup>. Estes inóculos foram incubados nas mesmas condições que os pré-inóculos, durante 24 horas. Seguidamente, um volume de inóculo já adaptado em soro (2% v/v) foi inoculado (Pescuma *et al.*, 2010), sendo os ensaios realizados em balões de Erlenmeyer de 200 mL, e incubados durante 6 dias, a uma temperatura de 37 °C, com agitação de 100 rpm, para promover o contacto das células com o substrato. Foram diariamente recolhidas amostras, de modo a efetuar: i) medição de pH (Lab 850, Schott AG, Mainz, Germany); ii) quantificação de lactose e ácido láctico; iii) análise do perfil

proteico, iv) quantificação da proteína total, v) isolamento da fração peptídica e vi) acompanhamento do crescimento microbiano.

### **2.3.1. Desenvolvimento microbiano durante a fermentação**

De forma a acompanhar o desenvolvimento dos microrganismos, durante o processo fermentativo, foram diluídas e inoculadas diariamente amostras dos ensaios em placas de MRS. As placas de Petri ( $\varnothing = 90$  mm) com MRS foram inoculadas com três gotas de 10  $\mu\text{L}$ , por cada diluição (Munsch-Alatossava *et al.*, 2007). Seguidamente, foram incubadas a 37 °C, durante 2 dias, em condições anaeróbias, numa jarra de anaerobiose (AnaeroPack, Mitsubishi, Japão), contendo uma saqueta geradora de atmosfera anaeróbia (Genbox Anaer, bioMérieux, França). Findo o tempo de incubação, as diluições contendo colónias individualizadas foram contadas e o número de unidades formadoras de colónia (UFC), por mL, foi aferido.

### **2.3.2. Quantificação de lactose e ácido láctico**

De modo a determinar o teor de lactose e ácido láctico, no soro, recorreu-se à técnica de *High Precision Liquid Chromatography* (HPLC), atingindo-se a separação dos compostos quer por exclusão por tamanho, no caso dos ácidos orgânicos, quer por exclusão iónica, no caso dos açúcares. Assim, para cada um dos compostos foi elaborada uma reta padrão, relacionando a concentração da substância com a área do pico, da mesma. Os compostos utilizados para cada reta padrão foram: lactose (Sigma-Aldrich, USA) e ácido láctico (Sigma-Aldrich, USA).

As amostras, depois de diluídas de 1:2 numa solução de 5 mM de ácido sulfúrico (Panreac, Espanha), foram sujeitas a uma centrifugação de 9300 g (Centrifuge 5415 D, Eppendorf Alemanha), durante 10 minutos, após a qual se procedeu à filtração do sobrenadante em filtros Millipore ( $\varnothing = 0,22$   $\mu\text{m}$ ). Foram efetuadas três réplicas de cada amostra, sendo injetados 10  $\mu\text{L}$  em cada corrida, recorrendo a um injetor automático 717plus Autosampler (Waters Corporation, EUA), numa coluna SUGAR SH1011 (Showa Denko America, Inc., EUA). Cada corrida teve a duração de 30 minutos, a uma temperatura de 50 °C, utilizando como eluente 5 mM de ácido sulfúrico (Panreac, Espanha), com um fluxo de 0,6 mL.min<sup>-1</sup> (515 HPLC Pump, Waters Corporation, EUA). A deteção dos compostos foi realizada em série, por medição da absorvância (210 nm), através de um detetor 486 Tunable Absorbance Detector (Waters Corporation, EUA) e por medição do índice de refração, através de um detetor 2410 Refractive Index (Waters Corporation, EUA). Os resultados foram finalmente processados através do software Empower Pro (Waters Corporation, EUA).

### **2.3.3. Análise do perfil proteico**

Para analisar o perfil proteico das amostras, foi utilizada a técnica de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), em sistema descontínuo (Laemmli, 1970). O gel concentrador era composto por 5% (m/v) de acrilamida (Sigma-Aldrich, EUA), 0,13% (m/v) de bisacrilamida (N,N'-metileno-bis-acrilamida) (Sigma-Aldrich, EUA), 125 mM Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% (m/v) de dodecil sulfato de sódio (SDS) (Merck, Alemanha), 0,1% (m/v) de persulfato de amónia (PSA) (Merck,

Alemanha) e 0,05% (v/v) de tetrametilenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich, EUA). O gel separador era constituído por 17,5% (m/v) de acrilamida, 10% (m/v) de glicerol, 0,1% (m/v) de bisacrilamida, 375 mM Tris-HCl (pH 8,8), 0,01% (m/v) de SDS, 0,03% (m/v) de PSA e 0,03% (v/v) de TEMED.

As amostras foram inicialmente preparadas em tampão de amostra redutor (SBR), composto por Tris-HCl 80 mM (pH 6,8),  $\beta$ -mercaptoetanol 100 mM (Sigma-Aldrich, EUA), 2% (m/v) de SDS, 15% (v/v) de glicerol (Panreac, Espanha) e 0,006% (m/v) m-cresol púrpura (Sigma-Aldrich, EUA). De seguida foram aquecidas, durante 2 minutos, a 100 °C, num termobloco (Bio TDB-100, Biosan, Letónia), e posteriormente centrifugadas a 13400 g, durante 5 minutos, sendo imediatamente utilizadas. Cada poço foi carregado com uma quantidade de proteína entre 5 e 15  $\mu$ g. O marcador de massa molecular utilizado (Precision Plus Protein – All Blue, BioRad, EUA) cobria o intervalo de massas entre 10 e 250 kDa.

A eletroforese decorreu em sistema vertical (Mini-PROTEAN Tetra Cell, BioRad, EUA), utilizando como tampão de corrida 25 mM Tris (), 192 mM glicina (Merck, Alemanha) (pH 8,8) e 1% (m/v) de SDS, a uma corrente constante de 20 mA, por gel, com tensão nunca acima dos 200 V (EPS 500/400, Pharmacia – LKB, EUA). A migração das proteínas foi dada como terminada, aquando da saída do m-cresol púrpura, pela parte inferior do gel. Cada gel foi fixado durante 20 minutos numa solução de 10% (m/v) de ácido tricloroacético (TCA) (Merck, Alemanha), tendo sido seguidamente corados durante 2 a 3 horas, com uma solução de 0,25% (m/v) de Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB R-250) (Merck, Alemanha), 25% (v/v) de 2-propanol (Panreac, Espanha) e 10% (v/v) de ácido acético (Panreac, Espanha), em agitação. Para a descoloração, o gel foi transferido para uma solução de 25% (v/v) de 2-propanol e 10% (v/v) de ácido acético. Todos estes processos foram sempre efetuados com agitação e à temperatura ambiente.

#### **2.3.4. Quantificação do teor de proteína total**

Para determinar a quantidade de proteína total presente nas amostras, foi utilizado o método de Lowry modificado (Bensadoun e Weinstein, 1976). Como padrão foi preparada uma reta de calibração com uma solução de albumina de soro de bovino (BSA) (Sigma-Aldrich, EUA), em diferentes concentrações. As amostras de soro colhidas ao longo da fermentação foram diluídas, com água destilada e desionizada, de forma a conterem entre 1 e 30  $\mu$ g de proteína, situando-se entre o intervalo da reta padrão. A 250  $\mu$ L de amostra diluída ou dos padrões de BSA, adicionaram-se 50  $\mu$ L de desoxicolato de sódio 1% (m/v) (Sigma-Aldrich, EUA) e 1 mL de ácido tricloroacético 10% (m/v) e, após 10 minutos de repouso, procedeu-se a uma centrifugação a 13400 g (Centrifuge 5415 D, Eppendorf Alemanha), durante 5 minutos, procedendo-se ao aproveitamento do *pellet*, contendo a proteína. Este foi ressuscitado em 1 mL de uma solução contendo 20 mg de bicarbonato de sódio (Merck, Alemanha), 4 mg de hidróxido de sódio (Merck, Alemanha), 1,6 mg de tartarato de sódio (Merck, Alemanha), 10 mg de SDS e 0,4 mg de sulfato de cobre (Merck, Alemanha), a qual foi incubada, durante 10 minutos. Seguidamente, foi adicionado 1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (Panreac, Espanha), diluído em partes iguais com água destilada e desionizada, sendo posteriormente efetuada uma homogeneização das amostras e a sua respetiva incubação, em

condições de escuridão, durante 2 horas. Finalmente, foi lida a absorvância de cada amostra, num espectrofotómetro (S 20 Spectrophotometer, Boeco, Alemanha) a um comprimento de onda de 750 nm. A quantidade de proteína presente em cada amostra foi aferida, por extrapolação linear, a partir da reta padrão de BSA.

### **2.3.5. Análise da fração polipeptídica de baixo peso molecular**

Para analisar a fração peptídica das amostras de soro fermentado, estas foram sujeitas a dois processos de ultrafiltração, sendo o primeiro realizado com um filtro de *Molecular Weight Cut-Off* (MWCO) de 10 kDa (Pall Corporation, EUA) do qual se recolheu o permeado. Seguidamente, este foi submetido a um novo processo de ultrafiltração, desta vez utilizando um filtro de MWCO de 3 kDa, do qual se aproveitou o retido, obtendo-se assim a fração proteica concentrada, desprovida de ácido láctico e dessalinizada, compreendida entre os 3 e os 10 kDa. Ambas as ultrafiltrações foram realizadas numa centrífuga Allegra 25R (Beckman Coulter, USA), a uma força constante de 3000 g, a 4 °C. O concentrado, contendo a fração polipeptídica de baixo peso molecular, foi guardado em frigorífico, a uma temperatura de 5 °C.

De modo a determinar a massa da fração proteica do concentrado obtido, foi calculado o peso seco de cada uma das amostras. Para isso, um volume definido de concentrado foi liofilizado, sendo registado o seu peso antes e após liofilização. O peso seco foi obtido por diferença das duas pesagens.

### **2.4. Determinação das concentrações mínimas inibitórias em *L. monocytogenes***

Antes da preparação dos inóculos de *L. monocytogenes*, esta foi refrescada através de duas passagens em meio Brain Heart Infusion (BHI) (Biokar, França), durante 24 a 48 h, a 37 °C. A preparação dos inóculos foi realizada através da medição de absorvância (Boeco S-20, Hamburgo, Alemanha), a 546 nm, obtendo-se uma absorvância final de 0.12 ( $2 \times 10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>) (Gottlieb *et al.*, 2008). A suspensão bacteriana contendo  $10^5$  UFC. mL<sup>-1</sup>, foi obtida por diluições em série, em meio de Müller-Hinton (Biokar, França).

A determinação das Concentrações Mínimas Inibitórias (CMIs) foi realizada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços (Greiner Bio-one, Alemanha), tal como descrito em Bouhdid *et al.* (2010). Para isso foram distribuídos 50 µL de meio de Müller-Hinton, desde o 2º até ao 12º poço. No 1º poço de cada linha, foram colocados 100 µL de amostra. As diluições da amostra foram realizadas, retirando 50 µL de um poço e diluindo-o de 1:2 no poço seguinte, sendo esta operação realizada desde o 1º até ao 10º poço. Seguidamente, foram inoculados 50 µL de uma suspensão bacteriana contendo uma concentração de cerca de  $2 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>, desde o 2º até ao 11º poço. O 11º poço serviu como controlo positivo de crescimento (50 µL de meio de Müller-Hinton + 50 µL de suspensão bacteriana) e o 12º poço serviu como controlo negativo de crescimento (100 µL de meio de Müller-Hinton). As placas foram incubadas, durante 24 h, a 37 °C, sendo feitas leituras da absorvância, depois da calibração efectuada em relação ao 12º poço (546 nm), num leitor de placas (Synergy HT, Biotek, EUA) logo após a inoculação e no final do ensaio.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Ensaios preliminares

No início deste estudo, de forma a otimizar as condições de fermentação, foi utilizado soro de mistura de vaca, cabra e ovelha, o qual foi fermentado com o consórcio inicialmente presente (*Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris*, *Lactococcus lactis lactis* biovar. *diacetylactis*, *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus*) e com um reforço de *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Este tipo de soro foi utilizado, uma vez que estudos realizados previamente (Martins, 2013; Santos *et al.*, 2015) mostraram uma elevada hidrólise das principais proteínas do soro, nomeadamente da  $\alpha$ -lactalbumina.

A Figura 5 mostra que, tal como esperado, o abaixamento do pH é dependente da produção de ácido láctico, tendo o primeiro sofrido um decréscimo acentuado, ao fim das primeiras 24 horas, tomando valores de cerca de 3,5 e mantendo-se praticamente estável até ao final da fermentação. Em termos da produção de ácido láctico, esta apresentou um crescimento acentuado, até às 72 horas, tendo-se mantido praticamente estável, com uma concentração de 20 g.L<sup>-1</sup>, até ao final da fermentação.

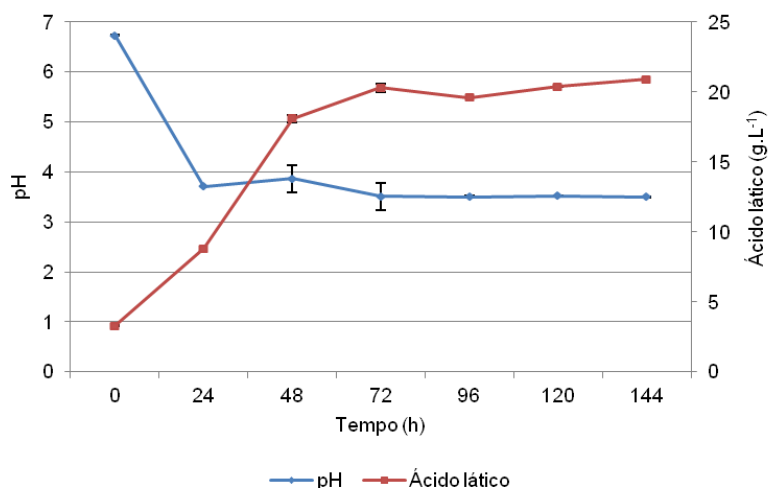


Figura 5 – Evolução do pH e produção de ácido láctico, durante a fermentação do soro de mistura. Os valores apresentados correspondem às médias das observações ( $n=3$ )  $\pm$  DP.

Em termos do perfil proteico, a Figura 6 mostra que, ao fim de 48 horas, existe uma diminuição da intensidade da banda correspondente ao peso molecular de aproximadamente 13 kDa, o que se pode traduzir num ataque proteolítico à  $\alpha$ -lactalbumina, já que esta proteína possui um peso molecular de 14 kDa (Brew, 2011). Para além de existir uma significativa degradação desta proteína, traduzida pelo desaparecimento da banda, observa-se também a formação de fragmentos de menores dimensões (< 10 kDa), podendo estes corresponder a péptidos. Contudo, a banda situada perto dos 15 kDa, correspondente à  $\beta$ -lactoglobulina, já que esta proteína apresenta uma dimensão de cerca de 18 kDa (Kontopidis *et al.*, 2004), permaneceu com a mesma intensidade, o que aponta para que esta proteína não tenha sido hidrolisada.

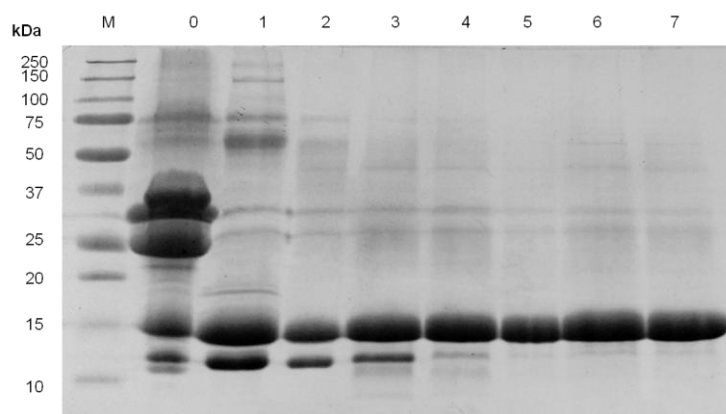


Figura 6 - Perfil proteico do soro de mistura, ao longo da fermentação, obtidos por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 17,5% (m/v), com 10% de glicerol. 0 – Leite de mistura, 1 – Soro de mistura, 2 a 7 – Dias 1 a 6 de fermentação. M – Marcador de peso molecular.

Uma vez que estes ensaios mostraram que com o consórcio utilizado apenas ocorre degradação da  $\alpha$ -lactalbumina, permanecendo a  $\beta$ -lactoglobulina intacta, decidiu avançar-se para uma abordagem diferente. Com o intuito de obter uma atividade proteolítica mais elevada e perceber se existiam diferenças de atividade antibacteriana, entre os três tipos de soro, foram utilizados soro de vaca, cabra e ovelha, em separado, e utilizadas bactérias lácticas diferentes das já estudadas.

### 3.2. Caracterização dos três tipos de soro

Neste trabalho foram utilizados três soros de diferentes origens, provenientes da produção de queijos de vaca, cabra e ovelha, sendo estes caracterizados em relação a diversos parâmetros físico-químicos, nomeadamente o teor proteico total, o pH e os teores de lactose e ácido láctico, como se pode observar na Tabela 7.

Tabela 7 – Parâmetros físico-químicos do soro de vaca, cabra e ovelha, antes da fermentação. Os valores apresentados correspondem às médias das observações ( $n=3$ )  $\pm$  desvio padrão (DP). Para cada coluna, os valores seguidos da mesma letra não diferem significativamente ( $p > 0,05$ ) entre si.

	Teor proteico (g.L <sup>-1</sup> )	pH	Lactose (g.L <sup>-1</sup> )	Ácido láctico (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Vaca</b>	4,18 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	6,25 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	39,87 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	< 1
<b>Cabra</b>	3,90 $\pm$ 0,43 <sup>a</sup>	5,19 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	56,06 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	< 1
<b>Ovelha</b>	6,33 $\pm$ 2,45 <sup>a</sup>	5,92 $\pm$ 0,10 <sup>c</sup>	56,50 $\pm$ 2,27 <sup>b</sup>	< 1

Como era de esperar, os três tipos de soro revelaram diferenças, ao nível dos diversos parâmetros físico-químicos avaliados. No que toca ao pH, este diferiu de modo significativo entre os três tipos de soro ( $p < 0,05$ ), o que sugere que esta variável depende do tipo de soro em causa, uma vez que o



leite pode ter sofrido diferentes níveis de fermentação, de acordo com o fabrico de queijo em causa. O facto de o soro de vaca apresentar um valor de pH próximo da neutralidade, sugere que o tipo de agente coagulante utilizado na produção de queijo foi enzimático, resultando assim em soro “doce”. Contudo, nenhum dos outros tipos de soro apresentou concentrações de ácido láctico quantificáveis, apesar dos valores de pH serem mais baixos.

Em termos da concentração de lactose, os soros de ovelha e de cabra apresentaram uma concentração de cerca de  $56 \text{ g.L}^{-1}$ , superior ao descrito na bibliografia (Jelen, 2011), para soro ácido, motivo pelo qual foi necessário diluir para uma concentração final de cerca de  $40 \text{ g.L}^{-1}$ .

A nível do teor proteico, embora os três tipos de soro não apresentem entre si diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), o soro de ovelha apresentou uma concentração média de proteína superior ao dos restantes soros ( $6,33 \text{ g.L}^{-1}$ ), ao contrário do soro de cabra que apresentou uma concentração de  $3,9 \text{ g.L}^{-1}$ , a mais baixa dos três. Estes dados estão de acordo com os apresentados por Hernández-Ledesma *et al.* (2011) que verificaram que a concentração das proteínas do soro era mais elevada no leite ovino do que nos restantes leites, bem como que o leite caprino possuía a concentração mais baixa, de entre os três.

Também se verificaram diferenças ao nível da abundância relativa das proteínas do soro, como se observa na Figura 7. Em termos de abundância, a  $\beta$ -lactoglobulina é a proteína mais abundante, sendo que o soro de ovelha apresentou maior quantidade de outras proteínas, tais como a lactoferrina, a albumina do soro e caseínas, ao passo que no soro de vaca apenas se conseguiram distinguir as bandas correspondentes à  $\beta$ -lactoglobulina e à  $\alpha$ -lactalbumina. Os perfis obtidos são semelhantes aos encontrados por Etzel (2004).

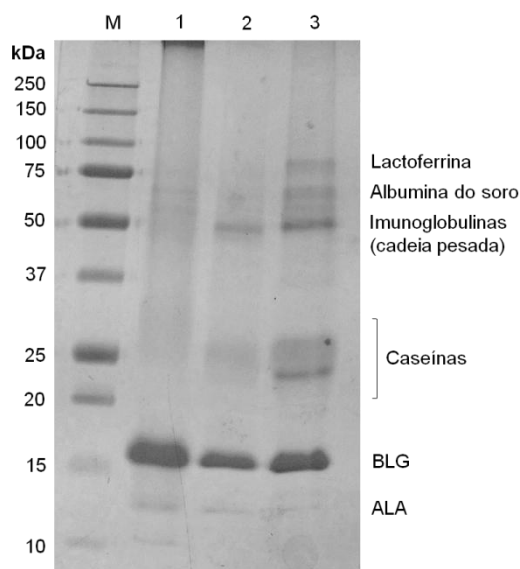


Figura 7 – Exemplo do perfil polipeptídico dos três tipos de soro: bovino (1), caprino (2) e ovino (3), obtido por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 17,5% (m/v), com 10% de glicerol. Algumas das principais proteínas do soro estão identificadas. M – Marcador de peso molecular, BLG -  $\beta$ -lactoglobulina, ALA -  $\alpha$ -lactalbumina.

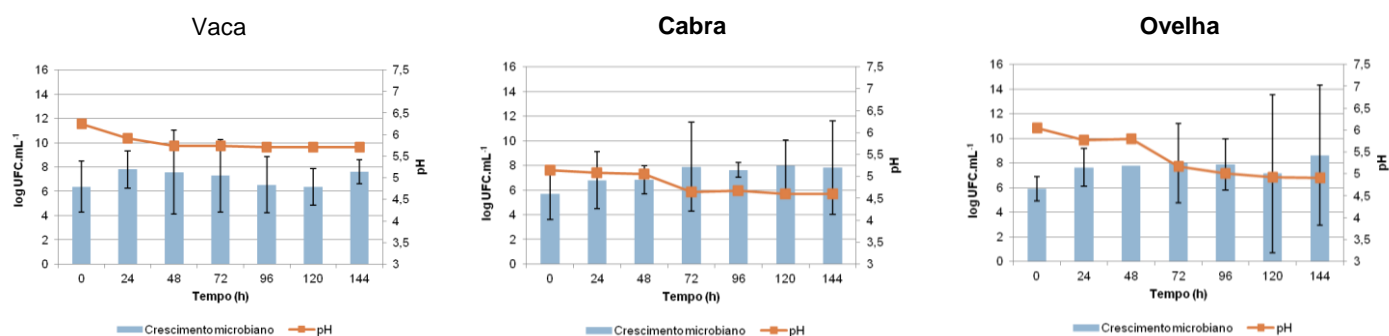
### 3.3. Avaliação da capacidade fermentativa

Neste trabalho foram utilizadas três estirpes diferentes daquelas que são comumente encontradas neste tipo de estudos, nomeadamente uma estirpe de *Lactococcus lactis*, organismo modelo do estudo da proteólise em bactéria lácticas (von Wright, 2012); uma estirpe de *Lactobacillus casei*, reconhecido probiótico associado a fermentações lácticas (Barrangou *et al.*, 2012), e uma estirpe de *Lactobacillus plantarum* (Leal-Sánchez *et al.*, 2003; Blana *et al.*, 2014), mais comumente associada a fermentações vegetais.

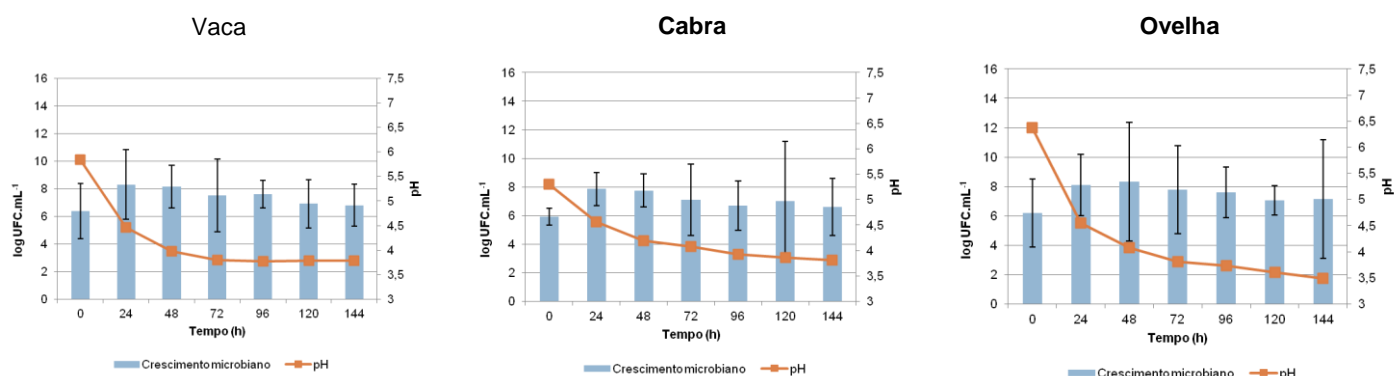
Na Figura 8 está representada a evolução do pH do soro e o respetivo crescimento bacteriano, durante as 144 horas de fermentação, através da fermentação com *Lactococcus lactis* (A), *Lactobacillus casei* (B) e *Lactobacillus plantarum* (C). Em termos gerais, as três estirpes atingiram valores de crescimento na ordem das  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e provocaram uma acidificação do meio, traduzida pelo abaixamento do pH, com exceção do *Lactobacillus plantarum*, que apresentou uma população constante (cerca de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>), nos soros de vaca e cabra, tendo os valores de pH do soro assumido um comportamento constante. Contudo, o soro de ovelha parece ser o tipo de soro mais adequado ao crescimento das três estirpes bacterianas, uma vez que levou à melhor *performance* destas.

O abaixamento do pH do soro, durante a fermentação com as três estirpes bacterianas, deveu-se sobretudo à produção de ácido láctico. Os resultados presentes na Figura 9, referentes ao consumo de lactose e consequente produção de ácido láctico, pelas três estirpes bacterianas mostram que tanto a estirpe utilizada, como o tipo de soro, são fatores importantes na obtenção de uma fermentação mais eficiente. Neste estudo, *L. casei* revelou ser a estirpe que mais ácido láctico produziu ( $p < 0,05$ ), nomeadamente ao nível dos soros bovino e ovino, onde este composto atingiu concentrações máximas de 8 e 10 g.L<sup>-1</sup>, respetivamente. Já as estirpes de *L. lactis* e *L. plantarum* não induziram uma produção significativa de ácido láctico, à exceção do soro ovino, onde a concentração foi significativamente mais elevada ( $p < 0,05$ ), atingindo valores de cerca de 5 g.L<sup>-1</sup>, para ambas as estirpes. Uma vez que *L. plantarum* é uma bactéria láctica maioritariamente associada a fermentações vegetais, como a fermentação das azeitonas (Leal-Sánchez *et al.*, 2003; Blana *et al.*, 2014), o seu desenvolvimento em produtos lácteos pode ter sido menos significativo, o que pode ter exercido influência sobre o seu desempenho. Trabalhos anteriores (Martins, 2012; Santos *et al.*, 2015) mostraram que a fermentação de um soro de mistura de vaca, cabra e ovelha com *L. plantarum*, em comparação com uma mistura de bactérias lácticas comercial, originou taxas de fermentação mais baixas e lentas, reforçando a opinião de que este possa não ser um substrato adequado ao crescimento deste microrganismo. Os resultados da fermentação podem ainda dever-se ao elevado teor proteico deste soro (cerca de 6 g.L<sup>-1</sup>), bem como à sua maior diversidade proteica, em comparação com os outros, que resulta na satisfação dos requisitos nutricionais, destes microrganismos que possuem uma elevada exigência em aminoácidos (Christensen *et al.*, 1999; Savijoki *et al.*, 2006).

A) *Lactococcus lactis*



B) *Lactobacillus casei*



C) *Lactobacillus plantarum*

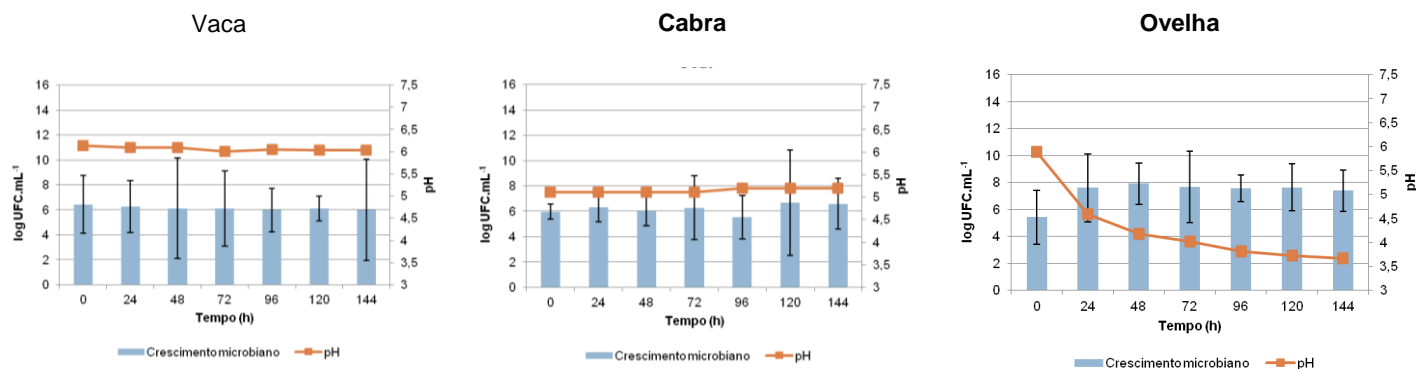
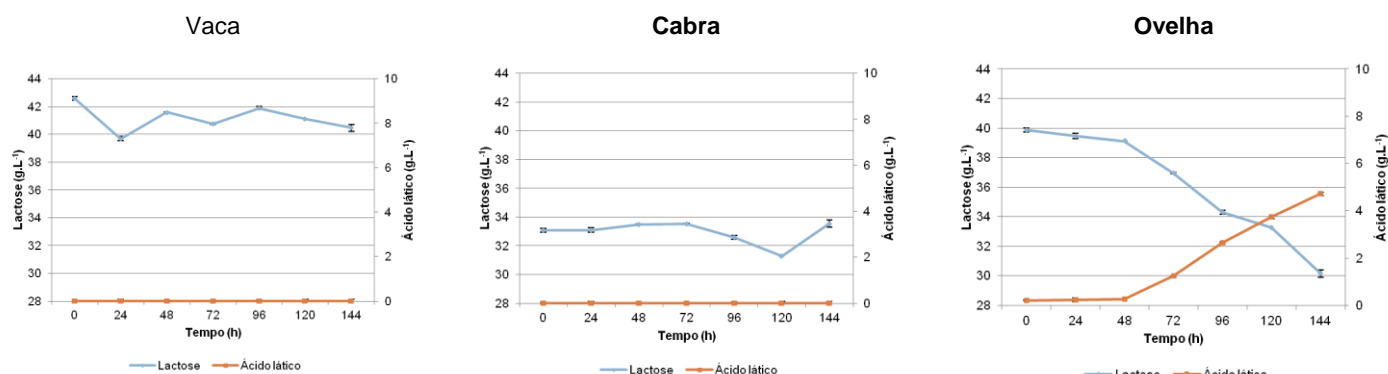


Figura 8 – Evolução do crescimento microbiano e pH, nos três tipos de soro, durante a fermentação com *L. lactis*, *L. casei* e *L. plantarum*. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3)  $\pm$  DP.

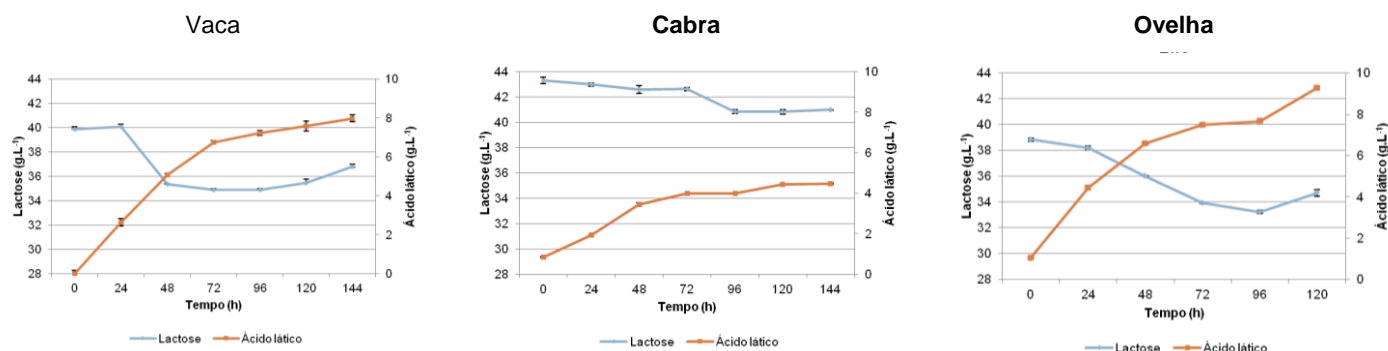
Outra explicação para o facto de não se ter conseguido uma fermentação da lactose total do soro, com consequente produção de mais ácido láctico, é o facto de este ter uma concentração demasiado elevada de lactose, que possa estar na base de um possível efeito de repressão enzimática. Assim, uma concentração demasiado elevada de lactose poderia ter exercido um efeito repressor sobre a enzima  $\beta$ -galactosidase. Para além disso, Prazeres *et al.*, na sua revisão em 2012, referem que a fermentação do soro, por parte deste tipo de bactérias, é influenciada por vários nutrientes, tais como vitaminas e minerais. Santos *et al.* (2015) constataram que a suplementação do soro com extrato de

levedura, rico em vitaminas do complexo B, levou a um aumento do desempenho fermentativo das bactérias lácticas testadas, nomeadamente em termos da produção de ácido láctico.

#### A) *Lactococcus lactis*



#### B) *Lactobacillus casei*



#### C) *Lactobacillus plantarum*

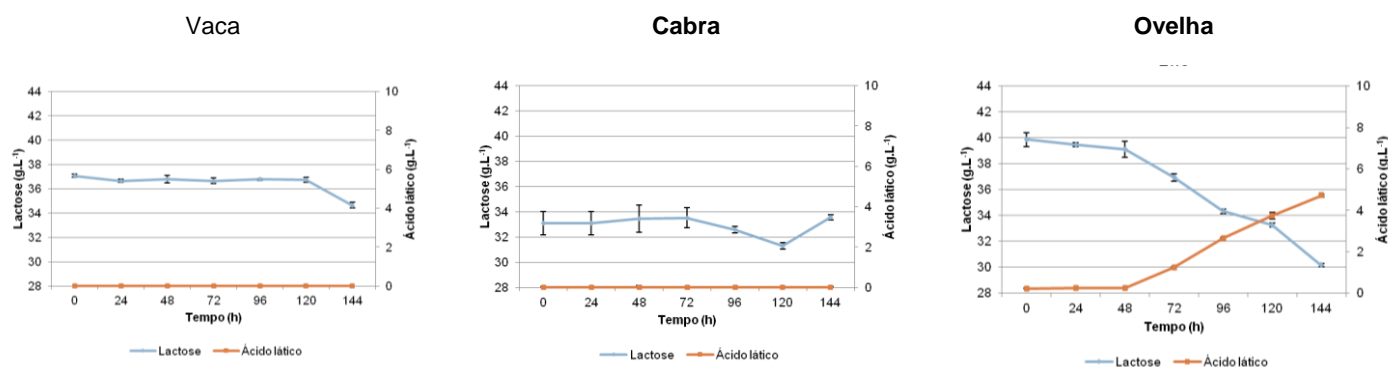


Figura 9 - Evolução das concentrações de lactose e ácido láctico, nos três tipos de soro, durante a fermentação com *L. lactis*, *L. casei* e *L. plantarum*. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3)  $\pm$  DP.

### 3.4. Avaliação da capacidade proteolítica

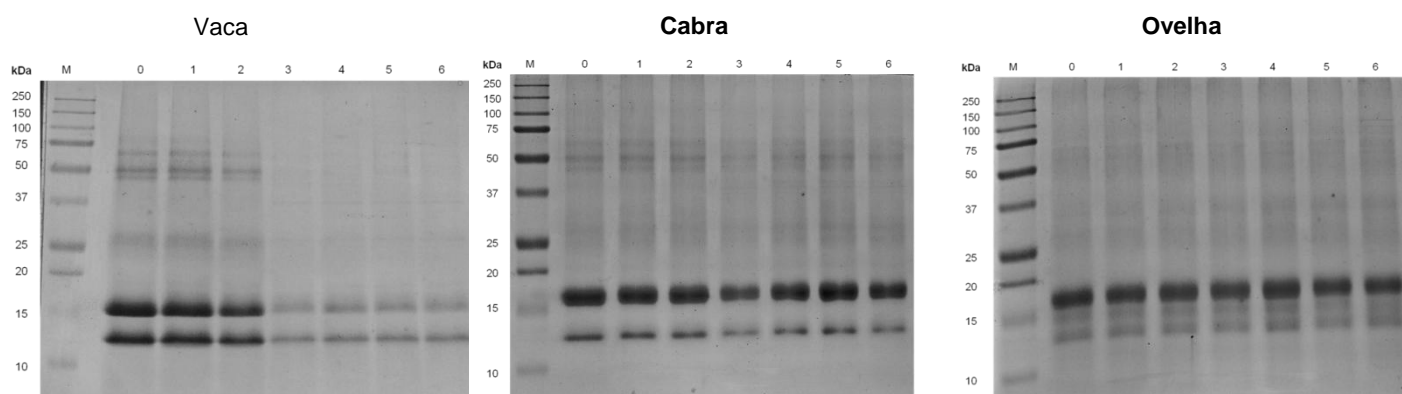
A hidrólise das proteínas do soro é importante para a obtenção de atividade antibacteriana, uma vez que leva à libertação de sequências polipeptídicas bioativas, inicialmente latentes na proteína original. Para além disso, está comprovado que a hidrólise completa ou parcial de certas proteínas do soro,

nomeadamente a  $\beta$ -lactoglobulina, através de fermentação lácticas, leva a uma redução da sua alergenicidade (Jedrychowski e Wróblewska, 1999). Contudo, até agora os estudos que têm sido publicados não atingem níveis de hidrólise da  $\alpha$ -lactalbumina e da  $\beta$ -lactoglobulina elevados. Desse modo, neste trabalho, foram também estudadas as atividades proteolíticas das estirpes escolhidas, dado não existir informação quanto a estas.

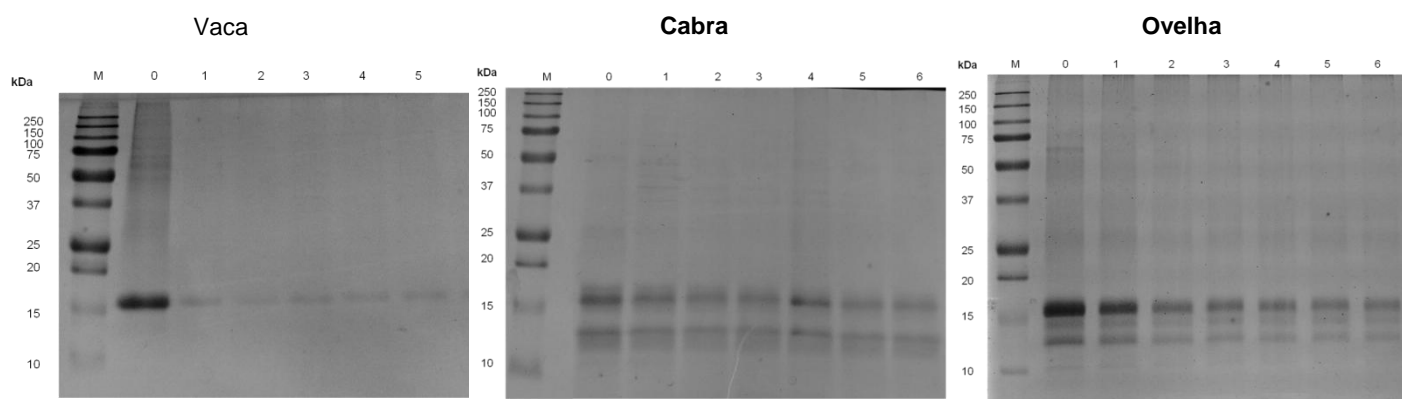
Na Figura 10 está representada a evolução do perfil proteico dos três tipos de soro, durante as 144 horas de fermentação com *L. lactis* (A), *L. casei* (B) e *L. plantarum* (C). Em termos globais, a atividade proteolítica mostrou ser variável consoante a combinação de estirpe de bactéria láctica e tipo de soro. Contudo, através da análise da Figura 11, é possível constatar que se obtiveram maiores percentagens de consumo de  $\alpha$ -lactalbumina, do que de  $\beta$ -lactoglobulina, o que pode ser traduzido pelo facto de esta última ser bastante resistente à atividade de proteases (Kontopidis *et al.*, 2004; Creamer *et al.*, 2011). Comparativamente, *L. casei* e *L. lactis* provaram ser as estirpes com maior atividade proteolítica em relação a estas proteínas, do que *L. plantarum*. No entanto, *L. casei* apresentou maiores taxas de degradação (> 50%) destas proteínas, em todos os tipos de soro, ao passo que *L. lactis* foi a única estirpe que exibiu maiores taxas de degradação (> 50%), apenas em soro de vaca. Estes resultados sugerem que diferentes estirpes podem possuir diferentes proteases, com capacidade de reconhecer sequências proteicas específicas, que diferem consoante a origem do soro.

No caso de *L. lactis*, sendo esta uma bactéria com reconhecida atividade proteolítica, sobretudo ao nível das caseínas, e por isso importante no desenvolvimento de aromas no queijo (Exterkate *et al.*, 2001; García-Cayuela *et al.*, 2012), seria de esperar que a sua atividade sobre as proteínas do soro fosse semelhante. Contudo, as Figuras 10A e 11A mostram que consoante o tipo de soro, o ataque proteolítico por parte de *L. lactis* é diferente, quer em termos de tempo de fermentação, quer em termos das proteínas alvo. Em geral, existe uma preferência pelas proteínas de peso molecular superior a 25 kDa, o que faz com que o ataque proteolítico à  $\beta$ -lactoglobulina e à  $\alpha$ -lactalbumina só se inicie, quando se deu um esgotamento das proteínas de dimensão superior (cerca de 48 a 72 horas depois da inoculação). Este resultado pode ser explicado pelo facto de a bactéria consumir primeiro as proteínas menos resistentes à ação das proteases e só depois as mais resistentes, como seja a  $\beta$ -lactoglobulina.

A) *Lactococcus lactis*



B) *Lactobacillus casei*



C) *Lactobacillus plantarum*

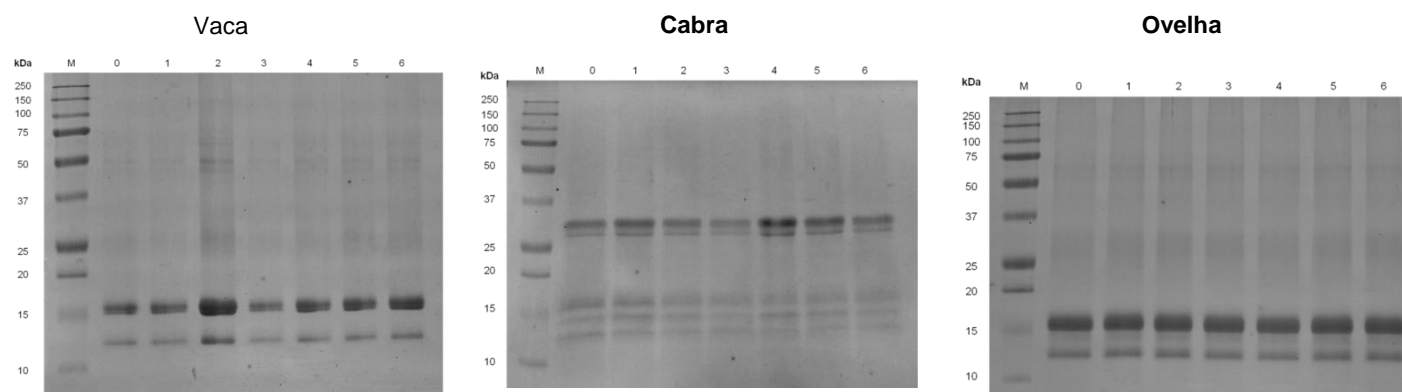


Figura 10 - Perfil polipeptídico dos três tipos de soro, fermentado com *L. lactis* (A), *L. casei* (B) e *L. plantarum* (C), durante as 144 horas, obtido por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 17,5% (m/v), com 10% de glicerol. Os números representam os dias da fermentação. M – Marcador de peso molecular.

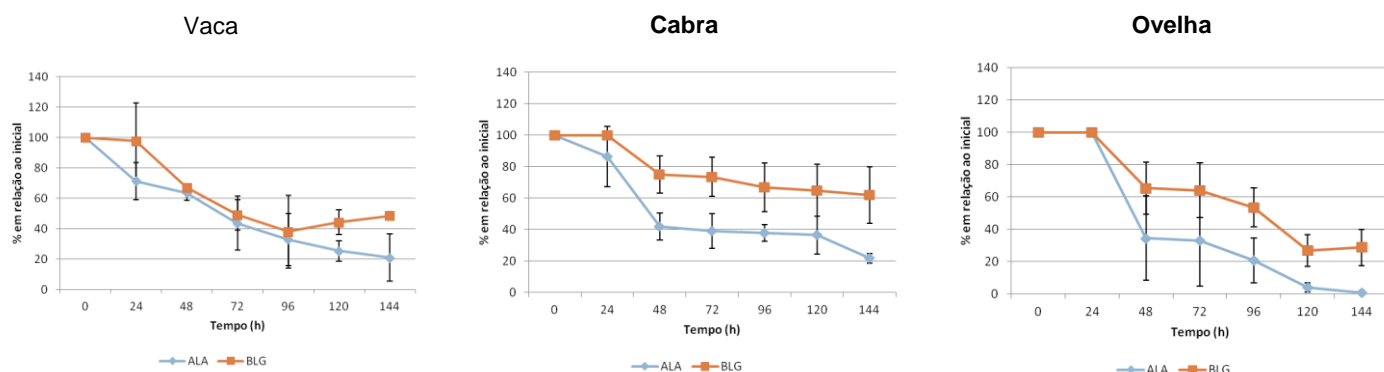
Quanto a *L. casei*, esta espécie é sobretudo conhecida por ser um probiótico, pelo que existem muito poucos estudos acerca da sua atividade proteolítica, em relação às caseínas e às proteínas do soro. Contudo, alguns trabalhos referem que a sua atividade proteolítica poder ser importante ao nível do desenvolvimento dos aromas do queijo, durante a maturação, à semelhança com outras bactérias lácticas (Khalid e Marth, 1990; Kholif *et al.*, 2011). Os resultados presentes nas Figuras 10B e 11B, revelam que a atividade proteolítica desta estirpe foi mais intensa no soro bovino e ovino, nomeadamente após 48 horas de fermentação, findas as quais, tanto as caseínas presentes no soro (bandas de dimensão entre 25 e 37 kDa), como as outras proteínas de maior dimensão, se encontravam hidrolisadas. No entanto, ambas as proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina foram consumidas quase na totalidade - acima de 90%, em relação ao controlo. Tal como nos ensaios com *L. lactis*, também nesta estirpe se verificou uma maior preferência quanto às proteínas de dimensão superior a 20 kDa, nomeadamente as caseínas, uma vez que o sistema proteolítico desta espécie está mais adaptado para a hidrólise destas, como se verificou no trabalho de Ong *et al.* (2007). Contudo, esta foi a única bactéria que, no período de tempo considerado, consumiu a quase totalidade das proteínas  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, em todos os soros.

No caso de *L. plantarum* (Figuras 10C e 11C), esta bactéria não promoveu uma hidrólise eficaz das proteínas em estudo, sendo que os máximos atingidos resultaram do ensaio com soro proveniente de queijo ovino. Este resultado mostra-se de acordo com os resultados obtidos na secção anterior, onde se observou que, quer o crescimento desta estirpe, quer a produção de ácido láctico, não foram significativos nos soros bovino e caprino. Para além disso, uma vez que esta bactéria é utilizada, sobretudo em fermentações vegetais, o seu comportamento proteolítico não é esperado ser tão eficaz para com as proteínas animais, nomeadamente as do soro de queijo.

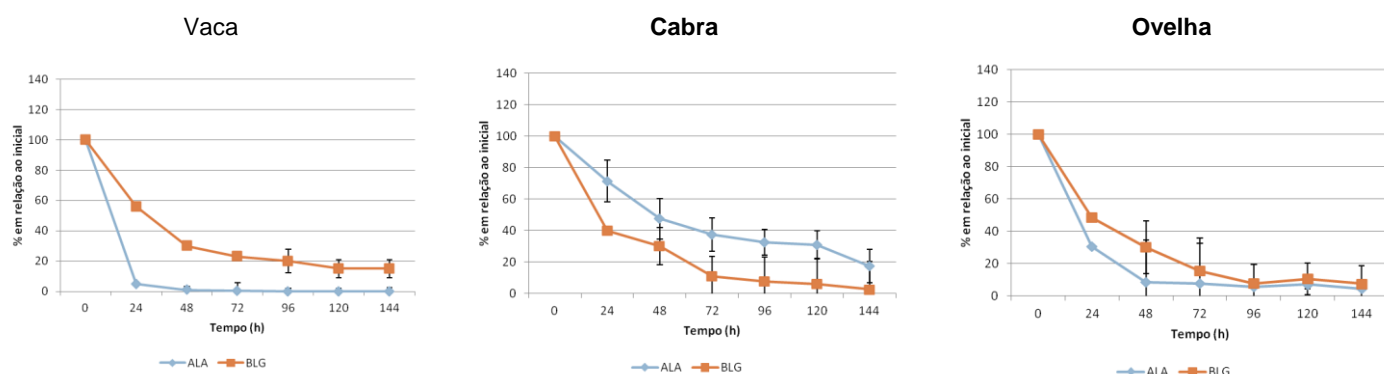
Comparativamente a Pescuma *et al.* (2007), onde se estudou o efeito da fermentação de soro com outras espécies de bactérias lácticas, durante um período de tempo mais curto (24 horas), os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a hidrólise das proteínas do soro depende, quer do tempo de fermentação e das estirpes utilizadas, quer do tipo de soro. Deste modo, uma fermentação mais longa poderá promover uma maior taxa de consumo das principais proteínas do soro.

Contudo, apesar de não ter ocorrido uma total hidrólise das proteínas do soro, nomeadamente da  $\beta$ -lactoglobulina, o principal alergénio do leite (Ehn *et al.*, 2005; Chatterton *et al.*, 2006), a sua parcial hidrólise pode apresentar vantagens. Um estudo recente evidenciou que o tempo de fermentação, tem uma influência direta com a redução da alergenicidade das proteínas do soro, mesmo que hidrolisadas parcialmente (Shi *et al.*, 2014). Desta forma, uma vez que a estirpe que obteve melhor *performance* fermentativa (i.e. maior consumo de lactose e produção de ácido láctico) foi *L. casei*, a fermentação com esta estirpe pode ser um bom meio de aumentar a digestibilidade e reduzir a alergenicidade de produtos à base de soro.

A) *Lactococcus lactis*



B) *Lactobacillus casei*



C) *Lactobacillus plantarum*

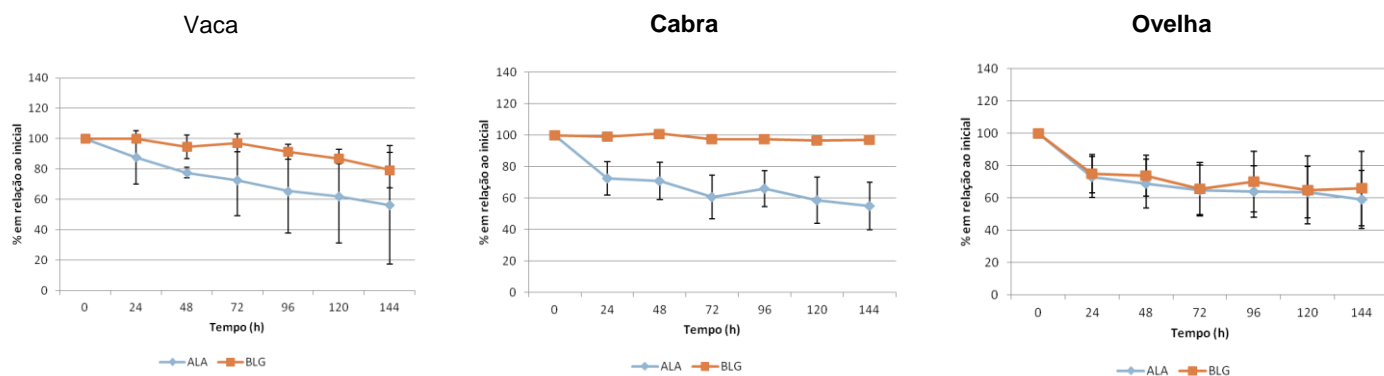


Figura 11 - Evolução da hidrólise da  $\alpha$ -lactalbumina (ALA) e da  $\beta$ -lactoglobulina (BLG), nos três tipos de soro, durante a fermentação com *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei* e *Lactobacillus plantarum*. Os valores apresentados correspondem às médias das observações ( $n=3$ )  $\pm$  DP.



### 3.5. Avaliação da atividade antibacteriana obtida através da fermentação

Como visto acima, a fermentação láctica do soro de queijo resulta na produção de ácido láctico e na hidrólise das principais proteínas do soro, que pode originar a libertação de sequências polipeptídicas específicas com efeito antibacteriano. De facto, existem já trabalhos que mostram que após fermentação com bactérias lácticas, o soro de queijo possui atividade antibacteriana, nomeadamente ao nível de *L. monocytogenes* (Martins, 2013; Santos *et al.*, 2015). Neste trabalho, tentou perceber-se se a fermentação realizada pelas 3 estirpes estudadas, ao nível dos diferentes soros, induziu atividade antibacteriana e se essa resultou da presença de ácido láctico, da presença de sequências polipeptídicas bioativas ou de um efeito sinérgico entre os dois. Para isso foram determinadas as concentrações mínimas inibitórias para o ácido láctico e para a fração de baixo peso molecular.

A Tabela 8 apresenta as concentrações mínimas inibitórias do ácido láctico e das frações de baixo peso molecular, determinadas para *L. monocytogenes*,

Tabela 8 - Concentrações mínimas inibitórias do ácido láctico e das frações polipeptídicas de baixo peso molecular, isoladas das amostras diárias dos três tipos de soro, ao longo da fermentação. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3). O hífen (-) representa a ausência de inibição.

		Concentrações mínimas inibitórias (mg.mL <sup>-1</sup> )						
Tempo (h)		0	24	48	72	96	120	144
Vaca	<i>L. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. casei</i>	-	22,75	11,35	2,72	2,64	22,75	-
	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-
Cabra	<i>L. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. casei</i>	36,5	22,2	11,1	10,6	-	21,6	11,3
	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-
Ovelha	<i>L. lactis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>L. casei</i>	-	28,8	6,03	3,15	5,7	5,79	6,79
	<i>L. plantarum</i>	-	-	-	-	-	-	-
Ácido láctico					1			

A atividade antibacteriana do ácido láctico, obteve uma concentração mínima inibitória de cerca de 1 g.L<sup>-1</sup>. Este resultado encontra-se em discordância com o publicado por Oh e Marshall, em 1993, que obtiveram uma concentração mínima inibitória de 5 g.L<sup>-1</sup>, para este composto. Zhang e Farber, em 1996, ao estudarem o efeito de diversos agentes antimicrobianos, na sobrevivência de *L. monocytogenes* em vegetais cortados, observaram que, em relação a uma lavagem com água corrente, soluções de ácido láctico de 5, 7 e 10 g.L<sup>-1</sup> não foram capazes de reduzir a carga microbiana em mais de 1 ciclo logarítmico.

De facto, o número de grupos carboxilo tem influência na atividade da molécula de ácido, pelo que os ácidos contendo apenas um destes grupos, como seja o caso do ácido láctico, possuem uma atividade menor do que aqueles que possuem mais do que um, como seja o caso do ácido cítrico (Akbas, 2007).

Uma vez que os ensaios fermentativos com as três estirpes, em soro ovino, resultaram em concentrações de ácido láctico entre os 5 e os 9 g.L<sup>-1</sup>, como se observa na Tabela 9, é espectável que a aplicação destes extratos resulte numa inibição do crescimento de *L. monocytogenes*. Contudo, na obtenção de atividade antibacteriana, nem todas as fermentações foram eficientes. Apenas os soros de vaca, cabra e ovelha fermentados com *L. casei* e do soro de ovelha fermentado com *L. plantarum* ou com *L. lactis*, obtiveram concentrações de ácido láctico acima de 1 g.L<sup>-1</sup>. Em particular, a colheita do soro ao fim de 48 a 72 horas, parece ser suficiente para que a concentração de ácido láctico seja suficiente para a atividade contra *L. monocytogenes*.

Tabela 9 – Concentrações de ácido láctico, nos três tipos de soro, fermentado ao longo das 144 horas. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3).

		Concentração de ácido láctico (mg.mL <sup>-1</sup> )						
Tempo (h)		0	24	48	72	96	120	144
Vaca	<i>L. lactis</i>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	<i>L. casei</i>	< 1	2,6	5,1	6,7	7,2	7,6	8
	<i>L. plantarum</i>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Cabra	<i>L. lactis</i>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
	<i>L. casei</i>	< 1	1,9	3,5	4	4	4,4	4,5
	<i>L. plantarum</i>	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1	< 1
Ovelha	<i>L. lactis</i>	< 1	< 1	< 1	1,2	2,6	3,7	4,7
	<i>L. casei</i>	1	4,4	6,6	7,5	7,7	8,2	9,3
	<i>L. plantarum</i>	< 1	1,2	3,1	4,6	6	6,4	6,9

As frações polipeptídicas de baixo peso molecular, induzidas pelas 3 estirpes, nos 3 tipos de soro também foram analisadas neste trabalho. Apesar de diversos trabalhos mostrarem a bioatividade das frações polipeptídicas (<10 kDa) provenientes da fermentação de leite, poucos são os trabalhos que o fizeram no soro proveniente de leite de cabra e ovelha, e menos ainda os que utilizaram as LAB estudadas neste trabalho.

Devido à ultrafiltração, as frações polipeptídicas isoladas continham os péptidos e os fragmentos das proteínas obtidos durante a fermentação, que apresentaram atividades antibacterianas (Tabela 8). Estas atividades variaram significativamente entre as estirpes utilizadas, bem como entre os tipos de

soro ( $p < 0,05$ ). Das três estirpes estudadas, apenas as frações obtidas por fermentação com *L. casei* - a estirpe mais proteolítica - mostraram ser capazes de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*. Estes resultados mostram que nem todas as bactérias são capazes de produzir péptidos antibacterianos a partir da  $\beta$ -lactoglobulina e da  $\alpha$ -lactalbumina. Uma vez que as amostras foram filtradas com um MWCO de 3 kDa, a atividade de péptidos produzidos pelas espécies, como sejam plantaricina e caseicina não poderão ser os responsáveis pelas atividades observadas, mas sim os produtos da hidrólise das proteínas do leite.

Comparativamente com as proteínas do soro bovino, poucos são os trabalhos que se baseiam na produção de péptidos bioativos, a partir de soros ovino e caprino (Almaas *et al.*, 2011; Hernández-Ledesma *et al.*, 2011). Uma vez que as sequências de aminoácidos destas proteínas são semelhantes, entre os vários tipos de soro (Zacharof e Lovitt, 2012), seria de esperar que a hidrólise das proteínas dos soros ovino e caprino originasse péptidos bioativos. Pela análise da Tabela 9, pode concluir-se que, de facto, os três tipos de soro tiveram efeito inibitório no crescimento de *L. monocytogenes*, na maior parte dos dias de fermentação. Contudo, esta atividade antibacteriana diferiu consoante o tipo de soro utilizado ( $p < 0,05$ ) e o tempo de fermentação ( $p < 0,05$ ).

A relação entre a hidrólise das proteínas, nomeadamente  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina, e a atividade antibacteriana não é linear, uma vez que um maior grau de hidrólise não levou a uma maior atividade antibacteriana. De facto, a atividade proteolítica por parte das bactérias lácticas tem como objetivo principal a aquisição de nutrientes essenciais, neste caso aminoácidos, para o desenvolvimento microbiano (Christensen *et al.*, 1999). Assim é de esperar que à medida que o processo fermentativo avança, os produtos da hidrólise proteica, tais como péptidos antimicrobianos, vão sendo consumidos pelas células, o que resulta numa diminuição da atividade antimicrobiana, ao longo do tempo. No entanto, aquando do início da hidrólise proteica, o potencial antimicrobiano é maior, pois não houve tempo para as bactérias consumirem os polipéptidos libertados. Neste caso, o pico de atividade antimicrobiana situa-se entre as 72 e as 96 horas do ensaio, intervalo de tempo durante o qual a  $\beta$ -lactoglobulina e  $\alpha$ -lactalbumina estão parcialmente hidrolisadas. Contudo, apesar de a atividade antibacteriana do soro de cabra não ter sido tão elevada (i.e. dadas as concentrações mínimas inibitórias serem mais elevadas), este induziu uma inibição do crescimento da bactéria alvo, ainda sem fermentação (0 horas), o que sugere que aquando da produção do queijo, as bactérias lácticas utilizadas como *starter* produziram péptidos antibacterianos.

Através da análise da Tabela 10, pode concluir-se que a concentração desta fração polipeptídica, nas amostras originais de soro, era inferior ao valor da concentração mínima inibitória observada. Contudo no soro bovino fermentado com *L. casei*, ao final de 72 e 96 horas, os valores da concentração aproximam-se dos valores da concentração mínima inibitória, o que pode levar a que exista algum potencial antibacteriano, que em conjunto com a atividade antibacteriana do ácido láctico apontam para este tempo de fermentação, como sendo ideal para utilizar para fins antibacterianos.

Tabela 10 - Concentrações da fração de baixo peso molecular, nos três tipos de soro, fermentado ao longo das 144 horas. Os valores apresentados correspondem às médias das observações (n=3).

		Concentração da fração de baixo peso molecular (mg.mL <sup>-1</sup> )						
Tempo (h)		0	24	48	72	96	120	144
Vaca	<i>L. lactis</i>	2	2,47	3,29	3,03	2,51	3,52	2,62
	<i>L. casei</i>	2,39	2,28	1,14	2,27	2,14	2,28	2,24
	<i>L. plantarum</i>	2,07	2,33	2,37	2,22	2,32	2,42	2,59
Cabra	<i>L. lactis</i>	2,46	2,39	2,23	3,03	2,39	2,72	2,71
	<i>L. casei</i>	1,82	2,22	2,21	2,13	2,24	2,15	2,26
	<i>L. plantarum</i>	2,27	2,26	2,35	2,37	2,36	2,31	2,36
Ovelha	<i>L. lactis</i>	2,8	2,79	2,78	2,8	2,79	2,8	2,79
	<i>L. casei</i>	1,85	2,88	2,39	1,25	2,3	1,36	1,65
	<i>L. plantarum</i>	2,78	2,77	2,81	2,79	2,77	2,77	2,79

Comparando o potencial bioativo do ácido láctico e dos polipéptidos do soro, uma vez que o primeiro se encontra em maior concentração, é possível concluir que a atividade antimicrobiana observada noutros trabalhos (Martins, 2013; Santos *et al.*, 2015) deriva, muito provavelmente, das elevadas concentrações de ácido láctico, resultantes do processo fermentativo, e não tanto da presença de sequências polipeptídicas, resultantes da hidrólise das proteínas do soro. Embora a concentração da fração de baixo peso molecular, no soro, seja próxima da concentração mínima inibitória para *L. monocytogenes*, esta continua a ser mais elevada do que a do ácido láctico. Assim, a utilização do soro fermentado como agente antibacteriano (e.g. na desinfecção de saladas) deverá ter em consideração a concentração de ácido láctico e não a concentração de polipéptidos antibacterianos.

Por outro lado, comparando as concentrações mínimas inibitórias do ácido láctico (1 g.L<sup>-1</sup>) e dos polipéptidos, às 72 horas (2,6 g.L<sup>-1</sup>), estas são muito próximas. Se se considerar que a massa calculada se refere à massa de todos os polipéptidos que se encontram abaixo dos 10 kDa, e não apenas de um péptido específico, podemos inferir que as concentrações mínimas inibitórias de um determinado péptido bioativo será mais baixa, do que a observada. Contudo, para se obter uma identificação mais fina seria necessário proceder a uma técnica de separação como HPLC de fase reversa, mas tal não foi possível no tempo disponível para a execução deste trabalho.

O isolamento e a identificação destes polipéptidos, bem como a sua utilização em concentrações adequadas, poderá ser útil para o desenvolvimento de alimentos nutracêuticos ou para a produção de novos compostos antibióticos, de origem alimentar, que não apresentem os efeitos secundários dos antibacterianos utilizados atualmente (e.g. desnaturação proteica, alteração do sabor e da cor), quer em medicina, quer na indústria alimentar.

## 4. CONCLUSÃO

O soro de queijo é o principal sub-produto da indústria queijeira, sendo produzido em grandes quantidades, a nível mundial. Outrora visto como um resíduo, é hoje encarado pela comunidade científica como um produto rico em nutrientes que pode e deve ser valorizado. Este trabalho, que teve como objetivo estudar o efeito da fermentação deste produto com bactérias lácticas, enquadra-se na ótica do aproveitamento e valorização dos nutrientes do soro para a indústria alimentar.

Numa sociedade em que cada vez mais consumidores se mostram preocupados com o efeito negativo dos aditivos alimentares de origem química, e onde os produtos naturais e sem alergénios são os preferidos, os estudos para o desenvolvimento de produtos que se enquadrem dentro desta ótica são inúmeros e diversos. Nesse sentido, este trabalho provou que a fermentação do soro de queijo constitui, não só uma maneira de valorizar este subproduto, mas também uma ferramenta importante para contornar o problema da intolerância à lactose e da remoção de proteínas alergénicas, com indução de atividade antibacteriana, através do recurso a bactérias probióticas.

Em geral, os resultados deste estudo apontam que o tipo de soro e a espécie de bactéria láctica utilizados são fatores importantes, quer para a obtenção de hidrólise das principais proteínas do soro, quer para a produção de ácido láctico. Para além disso, o tempo de fermentação é uma variável que deve ser tida em linha de conta, consoante o objetivo da fermentação: para obter maior hidrólise proteica e mais ácido láctico é importante prolongar o tempo de fermentação, mas para se obter atividade antibacteriana são necessários menos dias de fermentação.

De entre as três estirpes de bactérias utilizadas, *L. casei* provou ser a bactéria com maior capacidade fermentativa, nos três tipos de soro, bem como o melhor candidato para a redução da alergenidade das proteínas e para a remoção da lactose, para além do que mostrou a capacidade de hidrolisar quase na totalidade as proteínas do soro, algo que, até à data, não foi conseguido noutros trabalhos.

Esta bactéria demonstrou, também, ser a única espécie com capacidade para produzir sequências polipeptídicas antibacterianas. Estes resultados, conjuntamente com a maior produção de ácido láctico, apontam para o potencial de utilização desta bactéria, na produção de alimentos funcionais e nutracêuticos.

De futuro, seria interessante isolar e caracterizar os polipéptidos específicos produzidos por *L. casei*, em soro de vaca, bem como testar um maior número de microrganismos com importância a nível alimentar, com estes. Contudo, os resultados apresentados revelam claramente o potencial desta estirpe para a indústria alimentar, não só como agente antibacteriano, graças à produção de ácido láctico e péptidos bioativos, mas também para remover os alergénios comuns do leite.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akbas, M., 2007. Effectiveness of organic acid , ozonated water and chlorine dippings on microbial reduction and storage quality of fresh-cut. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2616, 2609–2616.
- Alakomi, H., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kaler, K., Helander, I.M., 2000. Lactic Acid Permeabilizes Gram-Negative Bacteria by Disrupting the Outer Membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66, 2001–2005.
- Almaas, H., Eriksen, E., Sekse, C., Comi, I., Flengsrud, R., Holm, H., Jensen, E., Jacobsen, M., Langsrud, T., Vegarud, G., 2011. Antibacterial peptides derived from caprine whey proteins, by digestion with human gastrointestinal juice. *The British Journal of Nutrition*. 106, 896–905.
- Argyri, A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.-A., Tsakalidou, E., Nychas, G.-J., Panagou, E., Tassou, C., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*. 33, 282–291.
- Hadiyanto, Ariyanti, D., Aini, A., Pinundi, D., 2014. Optimization of Ethanol Production from Whey Through Fed-batch Fermentation Using *Kluyveromyces marxianus*. *Energy Procedia*. 47, 108–112.
- Barrangou, R., Lahtinen, S., Ibrahim, F., Ouwehand, A., 2012. Genus *Lactobacillus*, in: Lahtinen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., von Wright, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Taylor and Francis, New York, pp. 77–91.
- Birkemo, G., O'Sullivan, O., Ross, R., Hill, C., 2008. Antimicrobial activity of two peptides casecidin 15 and 17, found naturally in bovine colostrum. *Journal of Applied Microbiology*. 106, 233–240.
- Björck, L., Rosén, C., Marshall, V., Reiter, B., 1975. Antibacterial activity of the lactoperoxidase system in milk against pseudomonads and other gram-negative bacteria. *Applied Microbiology*. 30, 199–204.
- Bjorkroth, J., Koort, J., 2011. Taxonomy and Biodiversity, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 45–48.
- Blana, V., Grounta, A., Tassou, C., Nychas, G.-J., Panagou, E., 2014. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiology*. 38, 208–218.
- Bolla, J.-M., Alibert-Franco, S., Handzlik, J., Chevalier, J., Mahamoud, A., Boyer, G., Kieć-Kononowicz, K., Pagès, J.-M., 2011. Strategies for bypassing the membrane barrier in multidrug resistant Gram-negative bacteria. *FEBS Letters*. 585, 1682–1690.



- Booyse, C., Dicks, L., Meijering, I., Ackermann, A., 2002. Isolation, identification and changes in the composition of lactic acid bacteria during the malting of two different barley cultivars. *International Journal of Food Microbiology*. 76, 63–73.
- Bouhdid, S., Abrini, J., Amensour, M., Zhiri, A., Espuny, M., Manresa, A., 2010. Functional and ultrastructural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*. 109, 1139–1149.
- Brew, K., 2011.  $\alpha$ -Lactalbumin, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 780–786.
- Brul, S., Coote, P., 1999. Preservative agents in foods - Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50, 1–17.
- Butel, M.-J., 2014. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 44, 1–8.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 50, 131–49.
- Carpenter, C.E., Smith, J. V, Broadbent, J.R., 2011. Efficacy of washing meat surfaces with 2% levulinic, acetic, or lactic acid for pathogen decontamination and residual growth inhibition. *Meat Science*. 88, 256–260.
- Carvalho, F., Prazeres, A., Rivas, J., 2013. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the Total Environment*. 445-446, 385–396.
- Chatterton, D., Smithers, G., Roupas, P., Brodtkorb, A., 2006. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin—Technological implications for processing. *International Dairy Journal*. 16, 1229–1240.
- Choi, J., Sabikhi, L., Hassan, A., Anand, S., 2012. Bioactive peptides in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*. 65, 1–12.
- Christensen, J., Dudley, E., Pederson, J., Steele, J., 1999. Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76, 217–246.
- Clare, D., Swaisgood, H., 2000. Bioactive milk peptides: a prospectus. *Journal of Dairy Science*. 83, 1187–1195.
- Comino, E., Riggio, V., Rosso, M., 2012. Biogas production by anaerobic co-digestion of cattle slurry and cheese whey. *Bioresource Technology*. 114, 46–53.
- Creamer, L., Loveday, S., Sawyer, L., 2011.  $\beta$ -Lactoglobulin, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 787–794.

De Angelis, M., Gobbetti, M., 2011. *Lactobacillus* spp.: General Characteristics, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 78–90.

De Wit, J., 1989. Functional properties of whey proteins, in: Fox, P. (Ed.), *Developments of Dairy Chemistry* (Vol. 4). Elsevier, London, pp. 285–321.

Docena, G., Fernandez, R., Chrído, F., Fossati, C., 1996. Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow ' s milk. *Allergy*. 51, 412–416.

Doeven, M., Kok, J., Poolman, B., 2005. Specificity and selectivity determinants of peptide transport in *Lactococcus lactis* and other microorganisms. *Molecular Microbiology*. 57, 640–649.

Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*. 17, 7843–7853.

Ehn, B.-M., Allmere, T., Telemo, E., Bengtsson, U., Ekstrand, B., 2005. Modification of IgE binding to beta-lactoglobulin by fermentation and proteolysis of cow's milk. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 53, 3743–3748.

Espitia, P., Soares, N., Coimbra, J., Andrade, N., Cruz, R., Medeiros, E., 2012. Bioactive Peptides: Synthesis, Properties, and Applications in the Packaging and Preservation of Food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 11, 187–204.

Etzel, M., 2004. Manufacture and Use of Dairy Protein Fractions. *The Journal of Nutrition*. 134, 996S–1002S.

Exterkate, F., Slangen, C., Siezen, R., 2001. Effect of genetically modified *Lactococcus lactis* cell-envelope proteinases with altered specificity on the course of casein degradation under cheese conditions. *International Dairy Journal*. 11, 363–371.

FAO, 2014. FAOSTAT. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>. Acedido em: 23.9.14

Farrell, H., Jimenez-Flores, R., Bleck, G., Brown, E., Butler, J., Creamer, L., Hicks, C., Hollar, C., Ng-Kwai-Hang, K., Swaisgood, H., 2004. Nomenclature of the proteins of cows' milk-sixth revision. *Journal of Dairy Science*. 87, 1641–1674.

Flower, D., 1996. The lipocalin protein family: structure and function. *Biochemistry Journal*. 318, 1–14.

Gall, H., Kalveram, C., Sick, H., Sterry, W., 1996. Allergy to the heat-labile proteins a-lactalbumin and b-lactoglobulin in mare's milk. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 97, 1304–1307.

- García-Cayuela, T., Gómez de Cadiñanos, L., Peláez, C., Requena, T., 2012. Expression in *Lactococcus lactis* of functional genes related to amino acid catabolism and cheese aroma formation is influenced by branched chain amino acids. *International Journal of Food Microbiology*. 159, 207–213.
- García-Ruiz, A., González de Llano, D., Esteban-Fernández, A., Requena, T., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M., 2014. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*. 44, 220–5. doi:10.1016/j.fm.2014.06.015
- Gobbetti, M., Stepaniak, L., Fox, P.F., Sorhaug, T., Tobiansen, R., 1995. Inhibition of endo- and amino-peptidase activities in cytoplasmic fractions of *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Propionibacterium* by peptides from different cheeses. *Milchwissenschaft*. 50, 565–570.
- Hafeez, Z., Cakir-Kiefer, C., Roux, E., Perrin, C., Miclo, L., Dary-Mourot, A., 2014. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. *Food Reserch International*. 63, 71–80.
- Hallgren, O., Aits, S., Brest, P., Gustafsson, L., Mossberg, A.-K., Wullt, B., Svanborg, C., 2008. Apoptosis and tumor cell death in response to HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 606, 217–240.
- Harnett, J., Davey, G., Patrick, A., Caddick, C., Pearce, L., 2011. *Streptococcus thermophilus*, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 143–148.
- Hayes, M., Ross, R.P., Fitzgerald, G., Hill, C., Stanton, C., 2006. Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. *Applied Environmental Microbiology*. 72, 2260–2264.
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Gómez-Ruiz, J., 2011. Bioactive components of ovine and caprine cheese whey. *Small Ruminant Research*. 101, 196–204.
- Hu, M., Zhao, H., Zhang, C., Yu, J., Lu, Z., 2013. Purification and Characterization of Plantaricin 163, a Novel Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* 163 Isolated from Traditional Chinese Fermented Vegetables. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 61, 11676–11682.
- Hutkins, R., 2006a. Cheese, in: Hutkins, R. (Ed.), *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 145–206.
- Hutkins, R., 2006b. Starter Cultures, in: Hutkins, R.W. (Ed.), *Microbiology and Technology of Fermented Foods*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 67–106.

- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A., Maneerat, S., 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control*. 22, 401–407.
- Jedrychowski, L., Wróblewska, B., 1999. Reduction of the Antigenicity of Whey Proteins by Lactic Acid Fermentation. *Food and Agricultural Immunology*. 11, 91–99.
- Jelen, P., 2011. Utilization and Products, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 4). Academic Press, London, pp. 731–737.
- Kabuki, T., Uenishi, H., Watanabe, M., Seto, Y., Nakajima, H., 2007. Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *Journal of Applied Microbiology*. 102, 971–980.
- Kawai, Y., Saito, T., 2011. Lactobacilli Bacteriocins, in: Sonomoto, K., Yokota, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 177–194.
- Khalid, N., Marth, E., 1990. Proteolytic Activity by Strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science*. 73, 3068–3076.
- Kholif, A., Mahran, G., El-Nawawy, M., Ismail, A., Salem, M., Zaky, W., 2011. Evaluation of Proteolytic Activity of Some Dairy Lactobacilli. *World Journal of Dairy Food Science*. 6, 21–26.
- Kontopidis, G., Holt, C., Sawyer, L., 2004. Beta-lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *Journal of Dairy Science*. 87, 785–796.
- Korhonen, H., Marnila, P., 2011. Lactoferrin, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 801–806.
- Korhonen, H., Pihlanto, A., 2003. Food-derived bioactive peptides-opportunities for designing future foods. *Current Pharmaceutical Design*. 9, 1297–1308.
- Kussendrager, K., van Hooijdonk, A., 2000. Lactoperoxidase: physico-chemical properties, occurrence, mechanism of action and applications. *The British Journal of Nutrition*. 84, S19–S25.
- Leal-Sánchez, M., Ruiz-Barba, J., Sánchez, A., Rejano, L., Jiménez-Díaz, R., Garrido, A., 2003. Fermentation profile and optimization of green olive fermentation using *Lactobacillus plantarum* LPCO10 as a starter culture. *Food Microbiology*. 20, 421–430.
- Leitch, E., Stewart, C., 2002. *Escherichia coli* O157 and Non-O157 Isolates Are More Susceptible to L-Lactate than to D-Lactate. *Applied Environmental Microbiology*. 68, 4676–4678.

Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R., 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. *BMC Genomics*. 11, 36.

Lopez-Kleine, L., Monnet, V., 2011. Proteolytic Systems, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 49–55.

Lü, X., Hu, P., Dang, Y., Liu, B., 2014. Purification and partial characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* TN-2 isolated from fermented camel milk (Shubat) of Xinjiang Uygur Autonomous region, China. *Food Control*. 43, 276–283.

Madureira, A., Pereira, C., Gomes, A., Pintado, M., Malcata, F., 2007. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Research International*. 40, 1197–1210.

Madureira, A., Tavares, T., Gomes, A., Pintado, M., Malcata F., 2010. Physiological properties of bioactive peptides obtained from whey proteins. *Journal of Dairy Science*. 93, 437–455.

Magalhães, K., Pereira, M., Nicolau, A., Dragone, G., Domingues, L., Teixeira, J., Silva, J., Schwan, R., 2010. Production of fermented cheese whey-based beverage using kefir grains as starter culture: evaluation of morphological and microbial variations. *Bioresource Technology*. 101, 8843–8850.

Mani-López, E., García, H., López-Malo, A., 2012. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Research International*. 45, 713–721.

Marnila, P., Korhonen, H., 2011. Immunoglobulins, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 807–815.

Martín, R., Susana, L., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M., Xaus, J., Fernández, L., Rodríguez, J., 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of Pediatrics*. 143, 754–758.

Martins, S., 2013. Avaliação dos extratos fermentados de soro de queijo em relação ao seu potencial em segurança alimentar. Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar - Processamento de Alimentos. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

McCann, K., Shiell, B., Michalski, W., Lee, A., Wan, J., Roginski, H., Coventry, M., 2006. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine  $\alpha$ S1-casein. *International Dairy Journal*. 16, 316–323.

Mills, S., Ross, R., 2011. *Lactococcus lactis*, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 132–137.

Adnan, A., Tan, I., 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*. 98, 1380–1385.

- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M., Ferrero, M., 2012. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*. 4, 531–541.
- Munsch-Alatossava, P., Rita, H., Alatossava, T., 2007. A faster and more economical alternative to the standard plate count (SPC) method for microbiological analyses of raw milks. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. 495–499.
- Oh, D., Marshall, D., 1993. Antimicrobial activity of ethanol, glycerol monolaurate or lactic acid against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 20, 239–246.
- Ong, L., Henriksson, A., Shah, N., 2007. Proteolytic pattern and organic acid profiles of probiotic Cheddar cheese as influenced by probiotic strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. paracasei*, *Lb. casei* or *Bifidobacterium* sp. *International Dairy Journal*. 17, 67–78.
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., Bunko, K., 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*. 105, 1–14.
- Pellegrini, A., Dettling, C., Thomas, U., Hunziker, P., 2001. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine b-lactoglobulin. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1526, 131–140.
- Pellegrini, A., Thomas, U., Bramaz, N., Hunziker, P., von Fellenberg, R., 1999. Isolation and identification of three bactericidal domains in the bovine a-lactalbumin molecule. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1426, 439–448.
- Pérez, M., Calvo, M., 1995. Interaction of beta-lactoglobulin with retinol and fatty acids and its role as a possible biological function for this protein: a review. *Journal of Dairy Science*. 78, 978–988.
- Permyakov, E., Berliner, L., 2000. alpha-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Letters*. 473, 269–274.
- Pescuma, M., Hébert, E., Bru, E., de Valdez, G., Mozzi, F., 2012. Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey. *Journal of Dairy Research*. 79, 201–208.
- Pescuma, M., Hébert, E., Mozzi, F., de Valdez, G., 2007. Hydrolysis of whey proteins by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Microbiology*. 103, 1738–1746.
- Pescuma, M., Hébert, E., Mozzi, F., de Valdez, G., 2008. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology*. 25, 442–451.

- Pescuma, M., Hébert, E., Mozzi, F., de Valdez, G., 2010. Functional fermented whey-based beverage using lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 141, 73–81.
- Prazeres, A., Carvalho, F., Rivas, J., 2012. Cheese whey management: a review. *Journal of Environmental Management*. 110, 48–68.
- Ribadeau-Dumas, B., Grappin, R., 1989. Milk protein analysis. *Lait*. 69, 357–416.
- Rubio, R., Jofré, A., Martín, B., Aymerich, T., Garriga, M., 2014. Characterization of lactic acid bacteria isolated from infant faeces as potential probiotic starter cultures for fermented sausages. *Food Microbiology*. 38, 303–311.
- Sánchez-Rivera, L., Martínez-Maqueda, D., Cruz-Huerta, E., Miralles, B., Recio, I., 2014. Peptidomics for discovery, bioavailability and monitoring of dairy bioactive peptides. *Food Research International*. 63, 170–181.
- Sanders, M., 2008. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*. 46, S58–S61.
- Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71, 394–406.
- Santos, M., Martins, S., Pedroso, L., Sousa, I., Ferreira, M., 2015. Potential bio-activity of whey fermented extract as sanitizer of organic grown lettuce. *Food Control*. 50, 477–481.
- Shi, J., Luo, Y., Xiao, Y., Li, Z., Xu, Q., Yao, M., 2014. Effects of fermentation by *Lactobacillus casei* on the antigenicity and allergenicity of four bovine milk proteins. *International Dairy Journal*. 35, 75–80.
- Sieuwerts, S., de Bok, F., Hugenholtz, J., van Hylckama Vlieg, J., 2008. Unraveling microbial interactions in food fermentations: from classical to genomics approaches. *Applied Environmental Microbiology*. 74, 4997–5007.
- Sieuwerts, S., Molenaar, D., van Hijum, S., Beerthuyzen, M., Stevens, M., Janssen, P., Ingham, C, de Bok, F., de Vos, W., van Hylckama Vlieg, J., 2010. Mixed-culture transcriptome analysis reveals the molecular basis of mixed-culture growth in *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Applied Environmental Microbiology*. 76, 7775–7784.
- Siezen, R., 1999. Multi-domain, cell-envelope proteinases of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76, 139–155.
- Smacchi, E., Gobetti, M., 2000. Bioactive peptides in dairy products: synthesis and interaction with proteolytic enzymes. *Food Microbiology*. 17, 129–141.

- Smit, G., Smit, B., Engels, W., 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 29, 591–610.
- Smithers, G., 2008. Whey and whey proteins—From “gutter-to-gold”. *International Dairy Journal*. 18, 695–704.
- Stefanitsi, D., 1995. The presence of two proteinases associated with the cell wall of *Lactobacillus bulgaricus*. *FEMS Microbiology Letters*. 128, 53–58.
- Théolier, J., Hammami, R., Labelle, P., Fliss, I., Jean, J., 2013. Isolation and identification of antimicrobial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. *Journal of Functional Foods*. 5, 706–714.
- Tong, Z., Ni, L., Ling, J., 2014. Antibacterial peptide nisin: A potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides*. 60, 32–40.
- von Wright, A., 2012. Genus *Lactococcus*, in: Lahtinen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., von Wright, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Taylor and Francis, New York, pp. 53–76.
- von Wright, A., Axelsson, L., 2012. Lactic Acid Bacteria: An Introduction, in: Lahtinen, S., Ouwehand, A., Salminen, S., von Wright, A. (Eds.), *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Taylor and Francis, New York, pp. 1–16.
- Wang, C., Chang, T., Yang, H., Cui, M., 2014. Surface physiological changes induced by lactic acid on pathogens in consideration of pKa and pH. *Food Control*. 46, 525–531.
- Wang, C., Chang, T., Yang, H., Cui, M., 2015. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of *Salmonella Enteritidis*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*. 47, 231–236.
- Wang, C., Wang, S., Chang, T., Shi, L., Yang, H., Shao, Y., Feng, W., Cui, M., 2013. Efficacy of lactic acid in reducing foodborne pathogens in minimally processed lotus sprouts. *Food Control*. 30, 721–726.
- Wynn, P., Morgan, A., Sheehy, P., 2011. Minor Proteins, Bovine Serum Albumin, Vitamin-Binding Proteins, in: Fuquay, J., Fox, P., McSweeney, P. (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (Vol. 3). Academic Press, London, pp. 795–800.
- Zacharof, M., Lovitt, R., 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*. 2, 50–56.



Zendo, T., Sonomoto, K., 2011. Classification and Diversity of Bacteriocins, in: Sonomoto, K, Yokota, A. (Eds.), Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp. 159–164.

Zhang, S., Farber, J.M., 1996. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*. 13, 311–321.